

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

**Développement d'outils de diagnostic pour le contrôle de la paratuberculose bovine :
détection d'anticorps polyclonaux dans des échantillons de sérum et de colostrum à
l'aide d'un ELISA et production d'anticorps monoclonaux**

Roupie, Virginie

Award date:
2002

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des sciences

**Développement d'outils de diagnostic pour le contrôle de la paratuberculose
bovine:**

**Détection d'anticorps polyclonaux dans des échantillons de sérum et de
colostrum à l'aide d'un ELISA et production d'anticorps monoclonaux.**

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences Biologiques
Roupie Virginie
Août 2002

**Développement d'outils de diagnostic pour le contrôle de la paratuberculose bovine:
Détection d'anticorps polyclonaux dans des échantillons de sérum et de colostrum à
l'aide d'un ELISA et production d'anticorps monoclonaux.**

Résumé:

La paratuberculose ou maladie de Johne est une maladie infectieuse du tractus digestif des ruminants à caractère chronique et incurable. Cette maladie est due à *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, une mycobactérie très résistante dans l'environnement et responsable d'importantes pertes économiques dues principalement à une réforme prématurée des animaux et à une diminution de la production laitière. Le contrôle de cette maladie est rendu difficile par le manque d'outils de diagnostic performants, principalement chez les animaux asymptomatiques pouvant transmettre la maladie. Ce mémoire s'inscrit dans un projet de développement d'outils de diagnostic de la paratuberculose.

Le laboratoire du Cerva a développé un ELISA indirect utilisant le lipoarabinomannan (LAM), un antigène immunodominant B. Le LAM de *M.paratuberculosis* porte des déterminants antigéniques communs à différentes mycobactéries, cet ELISA utilise donc une étape d'absorption des échantillons avec du LAM de *M.phlei*, une mycobactérie environnementale, afin d'en augmenter la spécificité. L'objectif était de mettre au point cet ELISA LAM sur le colostrum des bovins. Le protocole ainsi obtenu afin de tester le colostrum par l'ELISA LAM est comparable à celui du sérum. Nous avons ensuite testé des échantillons de colostrum provenant de 74 animaux afin de déterminer un cut-off, le sérum de ces mêmes animaux ont aussi été testé. La comparaison des résultats obtenus entre les colostrums et les sérums montre que l'ELISA LAM colostrum a une sensibilité et une spécificité comparable à l'ELISA LAM sérum. Cet ELISA LAM colostrum pourrait dans le futur être utilisé à des fins de certification de banques de colostrum. La comparaison des résultats sérologiques de l'ELISA LAM avec l'ELISA de la firme Pourquier et de l'ELISA LAM avec l'ELISA de la firme IDEXX, a montré que l'ELISA LAM semble avoir des caractéristiques intrinsèques comparables à l'ELISA de la firme Pourquier, tandis que l'ELISA de la firme IDEXX semble avoir des caractéristiques intrinsèques moins performantes que les deux autres.

Le LAM est commun à toutes les mycobactéries, mais chaque espèce du genre *Mycobacterium* possède des épitopes spécifiques. Trois fusions ont été effectuées afin de produire des anticorps spécifiques de *M.paratuberculosis*. Les deux premières fusions, une avec le kit commercial ClonaCell et l'autre avec un protocole classique, n'ont pas abouti. Les clones obtenus mourraient 15 jours après la fusion probablement à cause d'une infection des cellules de myélomes par des mycoplasmes. La troisième est en cours de clonage.

REMERCIEMENTS

Je remercie Jacques Godfroid, Sylvie Marché, Karl Walravens et Isabelle Danese de m'avoir accueillie dans leur laboratoire. Un grand merci aussi pour leurs nombreux conseils, leur disponibilité, et leurs encouragements.

Je remercie Franck Boalert et Eric Venot, pour leur aide précieuse en statistique.

Merci à toute l'équipe de techniciens, Anne-Françoise, Hilde, Sylvie, Christelle, Damien, Philippe, Patrick, et Luc pour leur aide précieuse et leur accueil chaleureux.

1.	INTRODUCTION.....	6
1.1.	L'AGENT PATHOGENE: <i>MYCOBACTERIUM AVIUM</i> SUBSP. <i>PARATUBERCULOSIS</i>	6
1.1.1.	<i>Les Mycobacteriaceae</i>	6
1.1.2.	<i>M.paratuberculosis</i>	8
1.1.3.	<i>La paroi mycobactérienne</i>	10
1.2.	EPIDEMIOLOGIE DE <i>M.PARATUBERCULOSIS</i>	14
1.2.1.	<i>Hôtes</i>	14
1.2.2.	<i>Transmission</i>	14
1.2.3.	<i>Prévalence et pertes économiques</i>	15
1.3.	PATHOGENIE	15
1.4.	LA MALADIE DE CROHN	17
1.4.1.	<i>La maladie</i>	17
1.4.2.	<i>Hypothèses étiologiques de la maladie de Crohn</i>	18
1.5.	REPONSE IMMUNITAIRE A L'INFECTION DE <i>M.PARATUBERCULOSIS</i>	19
1.5.1.	<i>Cinétique de la réponse immunitaire</i>	19
1.5.2.	<i>Cible de la réponse immunitaire</i>	20
1.6.	TESTS DE DIAGNOSTIC	22
1.6.1.	<i>Diagnostic direct</i>	22
1.6.2.	<i>Diagnostic indirect</i>	24
1.6.3.	<i>Applications diagnostiques</i>	25
1.7.	PREVENTION ET CONTROLE DE LA PARATUBERCULOSE	26
1.7.1.	<i>Traitement</i>	26
1.7.2.	<i>Prophylaxie</i>	26
1.7.3.	<i>La vaccination comme moyen de lutte</i>	27
2.	OBJECTIFS DU MEMOIRE	30
2.1.	DETECTION D' ANTICORPS POLYCLONAUX DANS LES ECHANTILLONS	30
2.1.1.	<i>Développement du test ELISA LAM à appliquer aux colostrums</i>	30
2.1.2.	<i>Comparaison de l'ELISA LAM avec deux ELISA commerciaux (Pourquier et IDEXX)</i>	30
2.2.	PRODUCTION ET CARACTERISATION D'ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGES CONTRE DES EPITOPES DE SURFACE DU LAM.....	31
3.	MATERIELS ET METHODES	32
3.1.	SOUCHES UTILISEES.....	32
3.2.	SERUMS UTILISES	32
3.3.	PROTOCOLE D'EXTRACTION DU LAM.....	32
3.4.	ELECTROPHORESE EN CONDITIONS DENATURANTES SDS-PAGE	33
3.5.	PREPARATION DES ECHANTILLONS DE COLOSTRUMS	35
3.6.	ENSEMENCEMENT DES MILIEUX DE CULTURE HEYM	35
3.7.	LAIT ECREME UHT COMMERCIAL	36
3.8.	SATURATION	36
3.9.	ELISA LAM	36
3.10.	ELISA POURQUIER	38
3.11.	ELISA IDEXX	39
3.12.	ANALYSE STATISTIQUE: TEST DE McNEMAR ET TEST DU KAPPA DE COHEN	40
3.12.1.	<i>Analyse de la discordance : le test de McNemar</i>	40
3.12.2.	<i>Analyse de la concordance : le test du Kappa de Cohen.</i>	41

3.13.	FUSION CELLULAIRE.....	41
3.13.1.	<i>Immunisation des souris</i>	41
3.13.2.	<i>Congélation et décongélation des cellules</i>	42
3.13.3.	<i>Obtention d'anticorps monoclonaux: ClonaCell™-HY: Hybridoma cloning kit.</i> ..	43
3.13.4.	<i>Préparation d'anticorps monoclonaux: méthode classique</i>	46
4.	RESULTATS.....	50
4.1.	PRINCIPE DE L'ELISA LAM ABSORBE	50
4.2.	PREPARATION DU MATERIEL DE L'ELISA LAM	51
4.2.1.	<i>Purification et caractérisation du LAM</i>	51
4.2.2.	<i>Détermination des dilutions des LAM de M.paratuberculosis et de M.phlei</i>	55
4.3.	VALIDATION DES TESTS ELISA LAM	58
4.4.	MISE AU POINT DE L'ELISA LAM SUR LE COLOSTRUM	59
4.4.1.	<i>Données préliminaires</i>	59
4.4.2.	<i>Comparaison des comportements du lait écrémé UHT et du colostrum dans l'ELISA LAM</i>	60
4.4.3.	<i>Traitement à la présure</i>	62
4.4.4.	<i>La saturation</i>	63
4.4.5.	<i>Dilution en série des colostrums</i>	64
4.4.6.	<i>Absorption des échantillons avec le LAM de M.phlei</i>	67
4.4.7.	<i>Conclusion de la mise au point de l'ELISA LAM sur le colostrum</i>	68
4.5.	TEST DES COLOSTRUMS	69
4.5.1.	<i>Présentation des résultats</i>	69
4.5.2.	<i>Calcul du cut-off et choix de la dilution des colostrums</i>	72
4.5.3.	<i>Application aux résultats</i>	73
4.6.	COMPARAISON SEROLOGIQUE DE L'ELISA LAM AVEC L'ELISA DE LA FIRME IDEXX ET L'ELISA DE LA FIRME POURQUIER	76
4.6.1.	<i>Comparaison entre l'ELISA LAM et l'ELISA IDEXX</i>	78
4.6.2.	<i>Comparaison l'ELISA LAM et l'ELISA Pourquoier</i>	78
4.6.3.	<i>Interprétation</i>	79
4.7.	LA FUSION CELLULAIRE.....	80
4.7.1.	<i>Résultats de l'immunisation des souris</i>	80
4.7.2.	<i>Les fusions</i>	81
5.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	82
5.1.	ELISA LAM.....	82
5.1.1.	<i>Mise au point de l'ELISA LAM sur le colostrum</i>	82
5.1.2.	<i>Test de colostrums</i>	83
5.2.	COMPARAISON SEROLOGIQUE DE L'ELISA LAM AVEC L'ELISA DE LA FIRME POURQUIER ET L'ELISA DE LA FIRME IDEXX	84
5.3.	PRODUCTION D'ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-LAM	85
6.	BIBLIOGRAPHIE.....	86

1. INTRODUCTION

La paratuberculose ou maladie de Johne, est une maladie infectieuse intestinale chronique chez les ruminants domestiques et sauvages causée par *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (*M.paratuberculosis*). Cette maladie s'étend à travers le monde surtout dans les régions tempérées et humides. Elle a été décrite pour la première fois en Allemagne en 1895 par H.A. Johne et L.Frothingam (Harris et Barletta, 2001).

Actuellement, la tuberculose bovine provoquée par *Mycobacterium bovis* est en voie d'éradication dans les pays de l'Union Européenne. Les efforts se tournent maintenant vers la paratuberculose qui provoque des pertes économiques très importantes, surtout dans les fermes laitières (Olsen *et al.*, 2002).

Beaucoup de pays initient des programmes de contrôle de la maladie mais des difficultés majeures rendent ces efforts peu efficaces. Ces difficultés résident dans le temps d'incubation très long de *M.paratuberculosis* ainsi que son diagnostic difficile chez les animaux asymptomatiques. Elles sont dues à une connaissance actuellement imparfaite de la pathogénie, de la réponse immunitaire, de la structure des mycobactéries ainsi que de l'épidémiologie de l'infection.

De plus, les similitudes cliniques et anatopathologiques entre la paratuberculose et la maladie de Crohn posent la question de savoir si *M.paratuberculosis* peut être l'agent étiologique de cette maladie chez l'être humain. Ce débat reste d'actualité (Cocito *et al.*, 1994).

1.1. L'agent pathogène: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

1.1.1. Les *Mycobacteriaceae*

➤ Classification et phylogénie

Les *Mycobacteriaceae* (figure 1) sont des bacilles gram +, non mobiles, caractérisées par leur acido-alcool résistance. Cette propriété est due à la composition particulière de leur paroi cellulaire (Rogall *et al.*, 1990). Actuellement plus de 82 espèces différentes de mycobactéries sont connues. Elles sont très répandues dans la nature, on les trouve dans les sols, les plantes, la poussière des maisons, l'eau etc. (Fonteyne 1997).

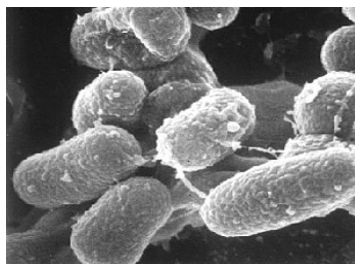


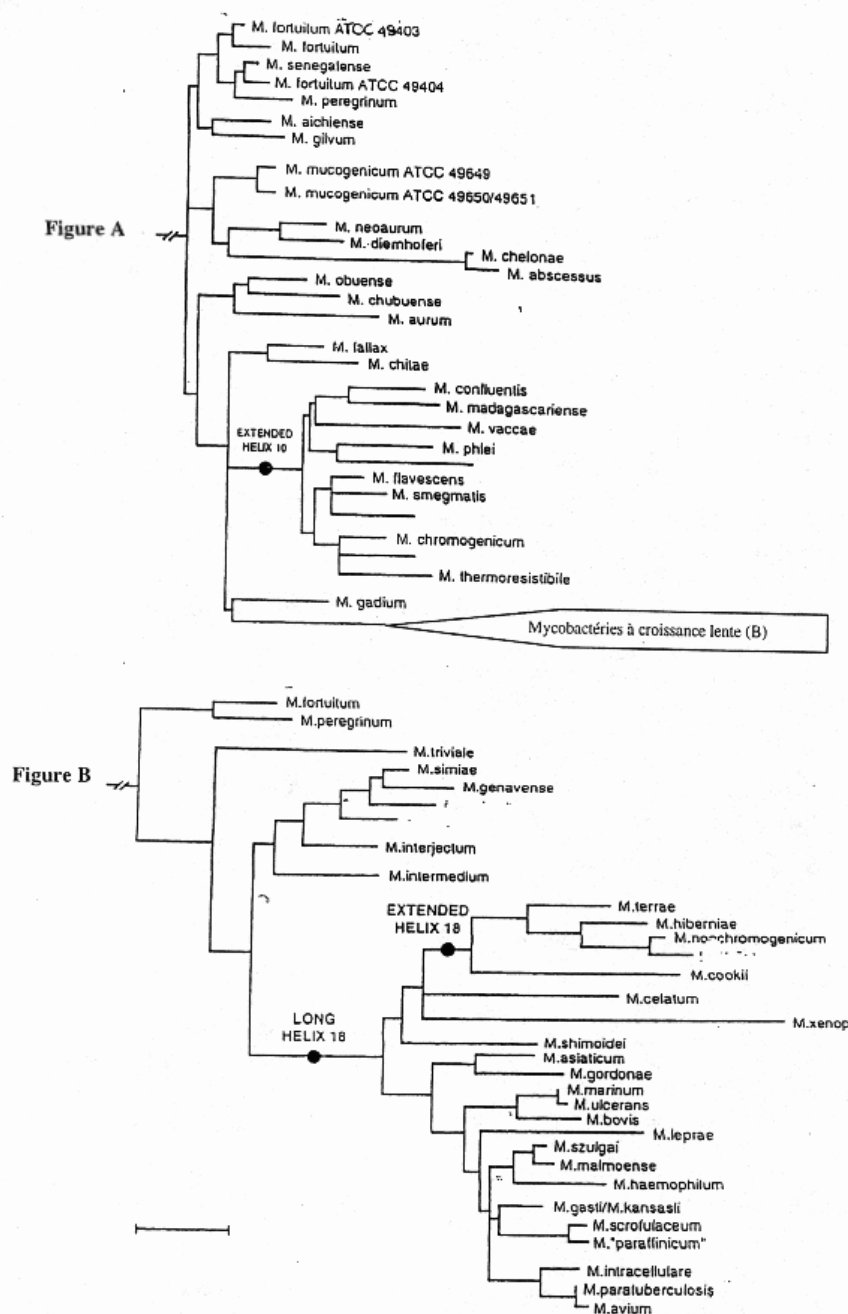
Figure 1: photographie au microscope électronique de mycobactéries. Le préfixe « myco » rappelle l'apparence de mycélium qu'elles présentent (Photo: Faculté de Médecine Vétérinaire du Wisconsin).

Les premières classifications ont été basées sur trois critères principaux utilisés encore actuellement. Il s'agit de la vitesse de croissance, de la pigmentation et des signes cliniques. Sur ces critères, quatre groupes ont pu être déterminés:

- ✓ Le groupe I contenant les mycobactéries à croissance lente et photochromogènes (les colonies formées produisent des pigments seulement en présence de lumière).
- ✓ Le groupe II contenant les bactéries à croissance lente et scotochromogènes (les colonies formées produisent des pigments en présence et en absence de lumière).
- ✓ Le groupe III contenant les bactéries à croissance lente et non photochromogènes (les colonies formées ne produisent jamais de pigments en présence de lumière).
- ✓ Le groupe IV contenant les bactéries à croissance rapide et à pigmentation variable.

Les mycobactéries formant des colonies visibles à l'œil nu en moins de 7 jours ont une croissance dite rapide, celles dites à croissance lente vont de 7 jours à plusieurs mois (Stahl et Urbance, 1990).

La figure 2 représente un arbre phylogénique établi à partir des séquences des ARN 16S des mycobactéries.



La phylogénie trouvée est:

- ✓ Le reflet de la séparation naturelle entre les mycobactéries à croissance rapide et celles à croissance lente.
- ✓ Le reflet partiel de la virulence. La plupart des mycobactéries pathogènes forment un groupe à l'intérieur des mycobactéries à croissance lente, figure 2B, (*M.bovis*, *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.paratuberculosis*, *M.leprae*, etc.)(Rogall *et al.*, 1990; Stahl et Urbance 1990).

Les membres de cette famille sont génétiquement très proches: la similarité au niveau de la séquence des gènes codant pour l'ARN 16S entre deux espèces de *Mycobacterium* est d'au minimum 95% (Stahl et Urbance, 1990).

➤ **Le complexe *M.avium***

Le complexe *Mycobacterium avium* (MAC) est un groupe hétérogène de mycobactéries à croissance lente comprenant des pathogènes de l'homme et de l'animal. Les membres de ce complexe sont les suivants:

- ✓ *M.avium subsp. avium* (*M.avium*).
- ✓ *M.avium subsp. paratuberculosis* (*M.paratuberculosis*).
- ✓ *M.avium subsp. intracellulare* (*M.intracellulare*).
- ✓ *M.avium subsp. sylvaticum* (*M. sylvaticum*).

M.avium et *M.intracellulare* sont des pathogènes pour les animaux mais ils sont aussi des opportunistes chez les hommes. *M.avium* infecte surtout les personnes immunodéprimées tandis que *M.intracellulare* les personnes immunocompétentes (Fonteyne, 1997).

M.sylvaticum est un pathogène aviaire qui peut causer l'entérite chronique chez les veaux mais n'a pas été encore associé à une maladie chez l'homme.

M.paratuberculosis est l'agent responsable de la maladie de Johne chez les ruminants et il pourrait être l'agent étiologique de la maladie de Crohn (Legrand *et al.*, 1999).

Ce n'est qu'en 1990, grâce aux travaux de l'équipe de Thorel que *M.paratuberculosis* a été décrit et accepté universellement en tant que sous-espèce du complexe *M.avium* (Thorel *et al.*, 1990). En effet *M.paratuberculosis* et *M.avium* sont génétiquement très proches: lorsque l'on compare les séquences codant pour les gènes de leur ARN 16S, il y a moins de 10 nucléotides de différence sur les régions variables, régions utilisées pour construire l'arbre phylogénique de la figure 2 (Springer *et al.*, 1996). D'autres études d'hybridations ADN-ADN ont montré une similarité de 99% à 100 % (Hurley *et al.*, 1988). Cette proximité génétique entre ces deux mycobactéries à longterm contribué à les considérer comme une même sous-espèce.

Afin de les distinguer, l'équipe de Thorel a utilisé 22 tests phénotypiques et biochimiques incluant la morphologie des colonies, la croissance sur différents milieux, la production de pigments, la tolérance à des inhibiteurs, la résistance aux antibiotiques, certaines activités enzymatiques et le contenu en acides mycoliques (Thorel *et al.*, 1990).

1.1.2. *M.paratuberculosis*

M.paratuberculosis est une mycobactérie aérobie, formant des colonies non chromogènes qui se développent de 8 à 16 semaines. Elle se distingue des autres par sa dépendance en mycobactine J, un sidérophore. Elle possède également une séquence d'insertion qui lui est unique: l'*IS900*.

Ces deux caractéristiques sont utilisées pour l'identification de *M.paratuberculosis*.

➤ **Mycobactine**

L'acquisition du fer est médiée chez les mycobactéries par des protéines que l'on appelle des sidérophores. On distingue deux classes de sidérophores:

- ✓ Les exochelines qui sont des protéines extracellulaires et solubles dans l'eau. Elles représentent probablement la principale source d'approvisionnement en fer nécessaire à la croissance des mycobactéries.
- ✓ Les mycobactines qui sont des protéines incluses dans la paroi mycobactérienne. (Barclay *et al.*, 1985; Barclay et Ratledge, 1983).

Les exochelines et les mycobactines sont produites spécifiquement en réponse à un manque de fer dans le milieu et possèdent une très forte affinité pour ce dernier. Un des rôles hypothétiques de ces deux sidérophores est le suivant: les exochelines rentreraient directement en compétition pour le fer présent dans l'environnement et les mycobactines faciliteraient le transport du fer des exochelines et de l'environnement dans le cytoplasme de la cellule (De Voss *et al.*, 1999).

Chez les mycobactéries, ces deux protéines sont souvent présentes ensemble. Toutefois, certaines possèdent soit l'une ou l'autre ou aucune de ces protéines: par exemple *M.tuberculosis* ou *M.bovis* produisent seulement de la mycobactine, *M.vaccae* produit seulement des exochelines, et *M.paratuberculosis* ne produit *in vitro* aucun type de sidérophore ce qui le rend très dépendant de son environnement (De Voss *et al.*, 1999).

M.paratuberculosis bien que possédant la capacité de synthétiser la mycobactine J, a besoin de cette dernière pour croître sur les milieux de culture. Le mécanisme par lequel la synthèse de la mycobactine ne s'effectue pas est inconnu (Barclay *et al.*, 1985; Barclay et Ratledge, 1983).

Mais cette dépendance peut être reliée à la présence de l'*IS900* unique à *M.paratuberculosis* (Naser *et al.*, 1998).

➤ **IS 900**

L'*IS900* est une séquence d'insertion fonctionnelle de 1.451pb intégrée dans le chromosome et présente à raison de 10 à 20 copies. Elle contient 2 cadres ouverts de lecture codés sur les brins opposés :

- ✓ l'une code pour une transposase (P43).
- ✓ l'autre pour une protéine hypothétique Hed.

La protéine Hed possède un motif composé de 9 acides aminés hydrophobes. Ce motif est homologue à celui de certaines séquences protéiques impliquées dans le transport de facteurs de croissance essentiels tel que le transport du fer. Cette constatation amène à spéculer sur le rôle possible de cette protéine comme un répresseur de la voie de synthèse des mycobactines (Harris et Barletta, 2001).

Le clonage de ce gène dans *M.smegmatis* a permis de montrer une corrélation entre la présence de l'*IS900* et la dépendance en mycobactine. Après transformation de *M.smegmatis* (une mycobactérie à croissance rapide) avec un phagemide recombinant contenant l'*IS900*, la vitesse de croissance de cette dernière est nettement diminuée, passant de 2 jours pour la souche sauvage à 12 jours pour la souche transformée. Alors que la transformation avec ce même phagemide d'une souche d'*E.coli* n'amène pas de modification dans le comportement de cette dernière. Le phénotype sauvage de *M.smegmatis* est retrouvé après l'ajout de mycobactine J dans le milieu (Naser *et al.*, 1998).

La problématique du mécanisme d'action du produit de l'*IS900* sur la voie de synthèse des mycobactines n'est pas connue de même que les modalités de fonctionnement de ce système chez les animaux et lors de la culture *in vitro* (Naser *et al.*, 1998).

1.1.3. La paroi mycobactérienne

Les genres *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Norcadia* et *Rhodococcus* possèdent une paroi distincte des bactéries gram + et gram -. Cette paroi leur confère la propriété d'être acido-résistant: après une coloration cette dernière va retenir le colorant malgré un traitement avec de l'acide. Cette propriété est due à la présence d'acide gras particuliers, les acides mycoliques, que possèdent tous ces genres et qui constituent une barrière hydrophobe autour de la bactérie. Le genre *Mycobacterium* contrairement aux autres genres possède en plus la propriété d'être alcool-résistant. En effet, ces acides mycoliques sont de types différents et plus complexes que ceux appartenant aux trois autres genres (Minnikin, 1991).

➤ **Structure des éléments de l'enveloppe mycobactérienne**

L'enveloppe mycobactérienne est constituée:

- ✓ d'une membrane plasmique,
- ✓ de peptidoglycan,
- ✓ d'un complexe mycolylarabinogalactan, constitué de l'arabinogalactan et des acides mycoliques,
- ✓ d'une pseudo-capsule,
- ✓ et de lipoarabinomannan (LAM).

Organisation de la paroi mycobactérienne:

La figure 3 est une représentation schématique de la structure de l'enveloppe mycobactérienne.

La paroi comprend un peptidoglycan, qui est lié de manière covalente à l'arabinogalactan via des liaisons phosphodiester.

L'arabinogalactan va être estérifié à ses extrémités avec les acides mycoliques (il y a environ 30 résidus d'acide mycolique par molécule d'arabinogalactan).

Des lipides, des glycolipides et quelques protéines sont associés à leur tour à l'extrémité externe des acides mycoliques. L'ensemble de ces molécules constitue la pseudo-capsule.

Le LAM traverse toute la paroi et il est ancré à la membrane plasmique par l'intermédiaire d'un phosphatidylinositol (McNeil et Brennan, 1991).

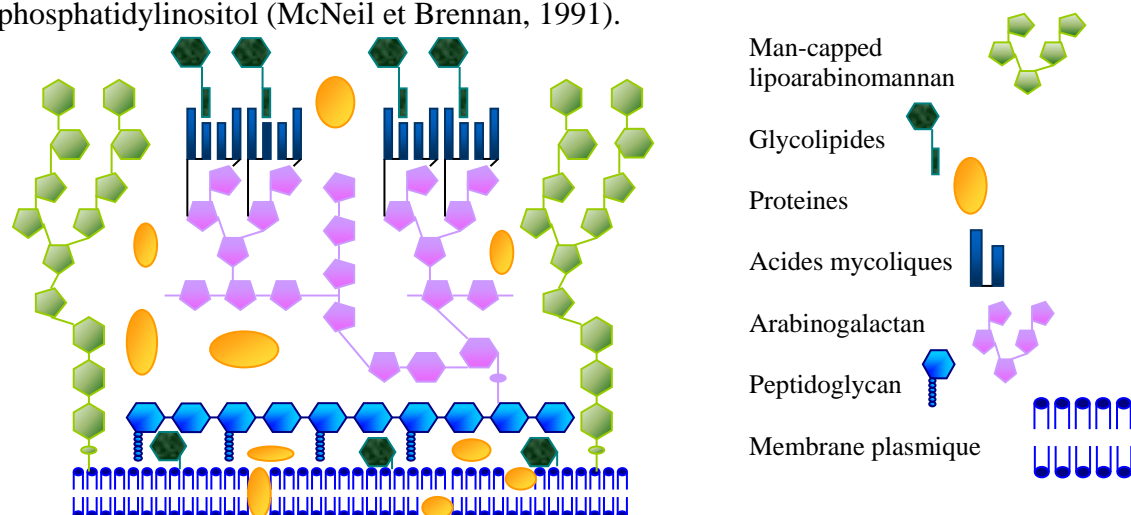


Figure 3 : représentation schématique de la structure de l'enveloppe mycobactérienne (Besra et Chatterjee, 1994).

Analyse par microscopie électronique d'une coupe fine de l'enveloppe mycobactérienne:

La figure 4 présente l'apparence de l'enveloppe des mycobactéries après micrographie électronique. La membrane plasmique est constituée de deux couches denses aux électrons séparées par une couche hydrophobe transparente. La couche externe de cette dernière apparaît plus épaisse que la couche interne. La raison de ce phénomène est sans doute liée au fait que la couche externe de cette membrane est associée aux sucres des glycolipides ainsi qu'aux molécules servant à ancrer le LAM. Le peptidoglycan et l'arabinogalactan constituent la seconde couche dense. Les acides mycoliques sont des molécules très hydrophobes qui empêchent les colorants de s'y fixer, ils apparaissent ainsi transparents aux électrons. La pseudo-capsule composée de lipides, de glycolipides et de quelques protéines est la couche la plus externe, elle apparaît variable dans son épaisseur et son apparence peut être fibrillaire, granulaire ou homogène (Brennan et Draper, 1994).

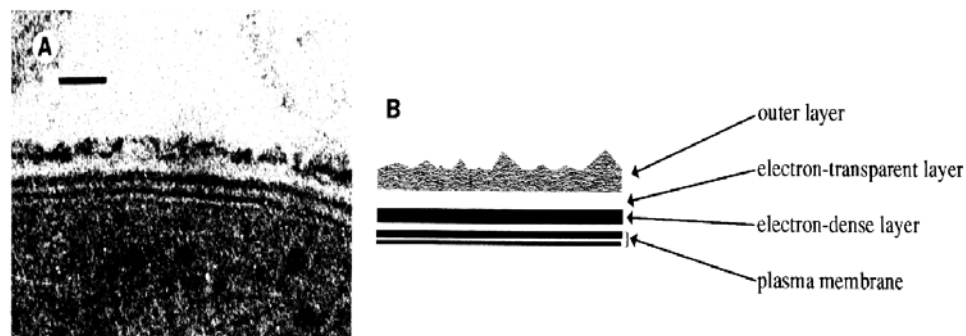


Figure 4: (A): micrographie d'une coupe fine de l'enveloppe mycobactérienne par microscopie électronique, la barre indique 30 nm. (B): interprétation de l'image (A) en terme de structure en couche de l'enveloppe (Brennan et Draper, 1994).

➤ **Les composants de l'enveloppe mycobactérienne**

La membrane plasmique:

Elle est semblable à celle de tous les autres groupes bactériens.

Le peptidoglycan:

Il est similaire à ceux trouvés dans des organismes comme *E.coli* (McNeil et Brennan, 1991).

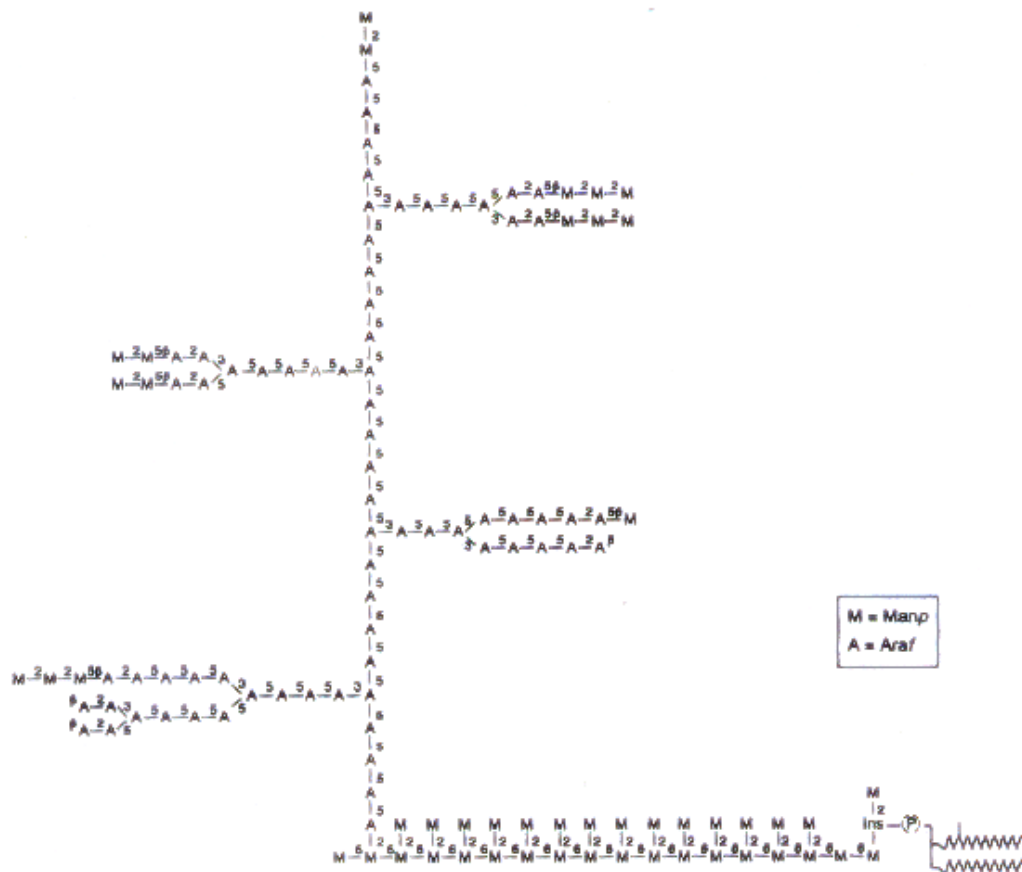
Le complexe mycolylarabinogalactan:

L'arabinogalactan est un polymère constitué exclusivement de résidus de D-mannose et de D-galactose. Sa structure n'est pas aussi bien connue que celle du peptidoglycan et des acides mycoliques (McNeil et Brennan, 1991).

Les acides mycoliques mycobactériens sont des acides gras à longue chaîne carbonée, alpha-ramifiés et bêta-hydroxylés (figure 5). Ce sont les plus grands acides mycoliques trouvés dans le monde bactérien, leur chaîne principale est constituée approximativement de 50 à 60 atomes de carbone et leur chaînes latérales, constituées de 20 à 24 atomes de carbone. De plus, seules certaines espèce du genre *Mycobacterium* synthétisent des acides mycolique porteurs de fonctions oxygénées supplémentaires (méthoxyl, cétone, époxyde, carboxylique).

M.paratuberculosis tout comme *M.avium* possède trois types d'acides mycoliques: les α -mycolates, les céto-mycolates, et les ester mycolates (Stahl et Urbance, 1990).

Ces acides mycoliques forment un domaine lipidique dans le complexe mycolylarabinogalactan. L'assemblage structural entre l'arabinogalactan et les acides mycoliques reste inconnu.



➤ Perméabilité de la paroi mycobactérienne

Les mycobactéries ont une paroi très imperméable. Cette imperméabilité est contrôlée par deux éléments principaux:

- ✓ La barrière hydrophobe formée par la couche des acides mycoliques.
- ✓ La pseudo-capsule composée de polysaccharides et de protéines (ancrés par une extrémité lipidique).

Les acides mycoliques empêchent l'entrée des petites molécules hydrophiles. Ces dernières peuvent passer par des pores formés de protéines ressemblant aux porines des bactéries gram -. Les petites molécules lipophiles peuvent passer directement à travers la couche lipidique.

La pseudo-capsule est commune dans sa structure à toutes les mycobactéries. Mais il est intéressant de constater que chez les mycobactéries à croissance lente (un groupe qui inclut les mycobactéries pathogènes les plus importantes) cette pseudo-capsule est plus épaisse. La pseudo-capsule empêche probablement les macromolécules de pénétrer l'enveloppe.

Une des principales conséquences de cette imperméabilité est la résistance aux antibiotiques et aux agents chimiothérapeutiques. *M. avium* et *M. paratuberculosis* sont globalement plus résistants que *M. tuberculosis* aux traitements antibiotiques (Nikaido et Jarlier, 1991).

1.2. Epidémiologie de *M.paratuberculosis*

1.2.1. Hôtes

Les hôtes naturels de *M.paratuberculosis* sont de nature très variée, même si les animaux ruminants domestiques (bovins, ovins et caprins) semblent être les animaux les plus exposés. On retrouve aussi des animaux infectés dans la faune sauvage et dans les zoos.

Les animaux sauvages touchés sont les suivants : lapins, bisons, élans, cerfs, belettes, certaines espèces d'oiseaux, souris, rats...(Harris et Barletta 2001; Olsen *et al.*, 2002).

Il a été montré qu'une souche de *M.paratuberculosis* isolée chez un lapin sauvage provoque chez un veau une infection caractéristique de la paratuberculose bovine. Les animaux sauvages pourraient ainsi contribuer à la transmission de la maladie (Beard *et al.*, 2001).

1.2.2. Transmission

➤ Sources majeures de la transmission fde *M.paratuberculosis*.

La source majeure de transmission vient principalement des fermes où se trouvent des ruminants infectés excréant des mycobactéries dans les matières fécales: ces animaux peuvent excréter jusqu'à 10^8 mycobactéries par gramme de matières fécales pendant la phase clinique (Kennedy et Benedictus, 2001). L'infection se produit le plus souvent par l'ingestion de nourriture, d'eau, de colostrum et de lait contaminés. Les jeunes animaux, au cours de leurs premières semaines de vie, forment la population la plus sensible à la paratuberculose.

Dans des étapes plus avancées de la maladie, *M.paratuberculosis* a été mis en évidence dans différents organes incluant le tractus reproductif femelle. La transmission de la maladie de la mère au fœtus peut donc se produire bien que cette forme de transmission soit rare comparée aux autres voies de transmission citées plus haut (Manning et Collins, 2001).

➤ Survie de *M.paratuberculosis* dans l'environnement.

Dans l'environnement, *M.paratuberculosis* se retrouve dans les matières fécales, le sol et l'eau.

Des matières fécales naturellement infectées par *M.paratuberculosis* ont été soumises à une variété de conditions naturelles comme le froid, la pluie, la lumière du soleil, le changement de température, etc. Le résultat de cette étude a montré que *M.paratuberculosis* est capable de survivre entre 152 et 246 jours dans l'environnement selon les conditions climatiques.

Les facteurs comme la sécheresse, un sol alcalin ($\text{pH} > 7$) et pauvre en fer contribuent à diminuer la survie de *M.paratuberculosis* (Manning et Collins, 2001).

Une étude menée au Michigan, a corrélié la séroprévalence de la paratuberculose mesurée au moyen d'un ELISA avec la composition des sols. Deux facteurs importants ressortent de cette étude: le pH acide du sol et la disponibilité en fer présent dans le sol sont associés à un risque accru de paratuberculose (Johnson-Ifearulundu et Kaneene, 1999).

Dans l'eau, la survie de *M.paratuberculosis* dépend surtout du pH. A un pH de 5.5 et à température ambiante, *M.paratuberculosis* a été isolé 9 mois après l'inoculation de l'eau stérile. Une autre expérience a été effectuée à une température de 38°C, dans le noir, dans laquelle les mycobactéries ont été isolées jusqu'à 17 mois après inoculation de l'eau lorsque le pH est neutre et jusqu'à 14 mois seulement lorsque le pH est inférieur à 5 ou supérieur à 8.5. En effet un pH

trop acide (pH<5) ou basique (pH>8) conduit à une inactivation plus rapide des mycobactéries (Manning et Collins, 2001). *M.paratuberculosis* est une mycobactérie très résistante dans le milieu extérieur et cette caractéristique contribue à la transmission de l'infection.

1.2.3. Prévalence et pertes économiques

La paratuberculose est une maladie qui touche tous les continents, bien que dans certaines régions ou dans certains pays la prévalence de cette l'infection semble très faible. Cette infection est plus fréquente dans les régions où le climat est tempéré, c'est à dire aux endroits où la pluie est fréquente et la nappe phréatique élevée. La paratuberculose est répandue dans toutes les régions importantes d'élevage (Boelaert, 1997).

De 1950 à 1980 la prévalence était principalement estimée par l'isolement de *M.paratuberculosis* dans les matières fécales des animaux. Actuellement la prévalence est le plus souvent estimée en utilisant des tests sérologiques couplés à la culture (Kennedy et Benedictus, 2001). La paratuberculose chez les animaux domestiques, et principalement dans les fermes laitières, entraîne de lourdes pertes économiques dues à la baisse de la production, aux frais vétérinaires, à la réforme prématurée des animaux (c'est à dire à l'abattage de ces animaux) (Manning et Collins, 2001).

Aux États Unis, elle est étroitement associée à la taille des troupeaux: 40% des fermes comptant plus de 300 bêtes sont infectées. Et elle cause la perte de 200 à 250 millions de dollars par an, pour l'industrie laitière.

En Australie, la séroprévalence chez les vaches laitières varie de 9 à 22%.

En Europe, la séroprévalence troupeaux de la paratuberculose bovine dans les élevages varie de 7 à 55% (Manning et Collins, 2001). En Belgique, le taux de prévalence pour les fermes laitières est estimé à 13 % et le taux de prévalence individuel à 5%. Une étude a montré que par exploitation infectée les pertes directes ont pu être estimées entre 1000 et 4000 Euro par an (Boelaert *et al.*, 2000; Godfroid *et al.*, 1997).

Le manque d'outils de diagnostic performants ne permet pas d'estimer de façon précise la prévalence réelle et la distribution exacte de l'infection (Kennedy et Benedictus, 2001).

L'épidémiologie de *M.paratuberculosis* n'est pas une situation statique, deux facteurs globaux peuvent influencer la prévalence de la maladie:

- ✓ L'augmentation du nombre d'hôtes susceptibles de développer la maladie de Johne.
- ✓ L'acidification de l'environnement.

La pollution environnementale menant à l'acidification des sols et de l'eau pose problème. La relation entre les changements dans l'écosystème et l'écologie des pathogènes comme *M.paratuberculosis* bien que peu étudiée, peut avoir un effet important (Manning et Collins, 2001).

1.3. Pathogénie

Les mycobactéries ingérées entrent dans la paroi intestinale par la muqueuse de l'intestin grêle. Les cellules M du dôme épithélial, couvrant les plaques iliaques de Peyer, ont la particularité de ne pas être bordées par des micro-villosités. Elles synthétisent beaucoup moins d'enzymes digestives et de mucus que les autres cellules de la muqueuse intestinale, elles offrent ainsi un site d'attachement facile pour les micro-organismes. Les micro-organismes vivants traversent ces

cellules par un phénomène de transit et ils sont phagocytés par les macrophages sous-épithéliaux. A l'intérieur de ces macrophages, *M.paratuberculosis* va résister à la dégradation des phagosomes et va se répliquer lentement. Les mycobactéries vont migrer dans le système monocyte/macrophage où elles peuvent survivre pendant un temps très long (Cocito *et al.*, 1994; Olsen *et al.*, 2002).

Différentes lésions ont été décrites, dépendant de l'avancée de l'infection et de l'espèce infectée. Les lésions macroscopiques classiques, montrées figure 7, décrites chez les bovins incluent un épaississement de l'iléum (bien que d'autres parties puissent aussi présenter ces caractéristiques) et des œdèmes au niveau des nodules lymphoïdes en plus de la distension des vaisseaux lymphatiques (Manning et Collins, 2001).

D'autres organes, particulièrement le foie et les nodules lymphoïdes hépatiques, peuvent présenter des lésions macroscopiques. Lorsque l'infection va progresser vers la maladie, la plupart des organes seront au fur et à mesure impliqués.



Figure 7: comparaison d'un iléon infecté et d'un iléon sain. La partie supérieure de la photo montre l'épaississement de l'iléon provoqué par la réponse inflammatoire générée par l'infection de *M.paratuberculosis*. La partie inférieure de la photo montre un intestin normal fin et flexible (Photo: Faculté de Médecine Vétérinaire du Wisconsin).

L'affection touche des animaux adultes surtout après une ou deux mise-bas, elle est exceptionnelle chez les femelles non reproductrices et les mâles. Les signes cliniques de la paratuberculose chez les bovins sont: une diarrhée chronique d'abord intermittente puis continue, profuse, rebelle à tout traitement antibiotique, et évoluant vers un amaigrissement allant jusqu'à la cachexie malgré un appétit qui reste normal, une soif augmentée et une diminution de la production de lait. L'étape clinique dure habituellement de 3 à 6 mois (Cocito *et al.*, 1994; Olsen *et al.*, 2002; Servais 1997).

L'augmentation de la soif et la présence de lésions perturbant l'activité de l'intestin, notamment du gros intestin, siège de la réabsorption de l'eau, explique la diarrhée. L'appétit étant maintenu, la quantité rejetée est plus abondante que normalement et les défécations plus fréquentes. L'amaigrissement résulte de perturbations graves du métabolisme des protéines. Ces perturbations provoquent une diminution de l'absorption intestinale des acides aminés et des pertes fécales en protéines. Dans un premier temps, des mécanismes compensatoires sont enclenchés mais en fin d'évolution, le bilan protéique devient négatif. On observe alors une hypoprotéïnémie et une hypo-albuminémie avec l'apparition éventuelle d'œdèmes (Bughin, 1997).

La maladie peut être classée en trois phases suivant l'excrétion de mycobactéries et l'apparition des symptômes cliniques

- ✓ Phase I: absence de signes cliniques et excrétion de mycobactéries indétectable. L'infection est contrôlée.

- ✓ Phase II: absence de signes cliniques et excrétion de mycobactéries dans les matières fécales. Pendant cette phase, la concentration des mycobactéries dans le lumen et la muqueuse intestinale va progressivement augmenter.
- ✓ Phase III: développement des signes cliniques avec excrétion de mycobactéries. Cette phase représente la phase terminale de l'infection avec l'expression des symptômes et la généralisation de l'infection. Cette phase se termine par la mort de l'animal (Cocito *et al.*, 1994; Kennedy et Benedictus, 2001).

Les animaux en phase asymptomatique vont toutefois causer des pertes financières pour le fermier qui va voir sa production de lait diminuer. Certains animaux resteront probablement infectés le reste de leur vie et certains d'entre eux excréteront de façon intermittente des mycobactéries dans les matières fécales. Ces animaux contribuent ainsi à la propagation de l'infection.

La résistance des bovins à l'infection dépend de l'âge. Pour développer la phase clinique, il faut que l'animal ait été contaminé pendant son plus jeune âge. Ce phénomène peut être dû au développement incomplet du système immunitaire et/ou à un meilleur accès aux plaques de Peyer qui s'atrophient avec l'âge (Olsen *et al.*, 2002).

Le temps d'incubation est long, les animaux présentant des signes cliniques sont souvent âgés de 2 ans. La plupart des animaux infectés avec *M.paratuberculosis* sont capables de contrôler l'infection et seulement 10 à 15% de ces animaux vont développer la maladie. Le taux de morbidité parmi ces animaux est d'environ 1% par an (Kennedy et Benedictus, 2001).

Le mécanisme immunopathologique impliqué dans l'apparition de la maladie n'est pas connu mais l'âge, l'état générale de l'animal, et les doses infectantes pendant un temps donné peuvent influencer le devenir de l'infection (Olsen *et al.*, 2002).

Une gamme de facteurs menant vers cette phase a été proposée: l'exploitation intensive, le sol acide, une nutrition déséquilibrée, le stress (comme celui dû aux transports), la lactation, la parturition, des agents immunosuppresseurs (comme certains virus bovins) (Kennedy et Benedictus, 2001).

1.4. La maladie de Crohn

1.4.1. La maladie

La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire chronique du tractus gastro-intestinal humain. Cette maladie se caractérise par un épaississement significatif de la paroi du tractus digestif. La muqueuse est souvent parsemée de crevasses superficielles ou d'ulcérations plus profondes avec la présence d'abcès ou de fistule. Tous les segments du tractus digestif peuvent être atteints (de la bouche à l'anus) mais les sites préférentiels sont l'intestin grêle et le colon. Les manifestations extra intestinales se retrouvent chez 25% des patients (Selby, 2000).

Le patient présente des signes cliniques très variables dépendant du site de l'inflammation. Toutefois, la diarrhée, les douleurs abdominales, la fatigue et la fièvre reviennent le plus souvent (Fonteyne *et al.*, 1997).

Il existe des traitements, qui sont souvent des combinaisons de plusieurs médicaments (antibiotiques, corticostéroïdes, agents immunosuppresseurs et des composants appartenant à la famille des 5 aminosalicyliques). Malgré la gamme de médicaments disponibles, 80% des patients auront recouru à la chirurgie au cours de leur maladie, c'est à dire qu'ils subiront une résection de la partie atteinte du tube digestif (Selby, 2000).

L'évolution de la maladie est imprévisible et se compose de rechutes entrecoupées de périodes de rémission. Seulement 15% des patients atteints ne présenteront plus aucun symptôme de la maladie pendant les 20 années qui suivent le diagnostic.

L'incidence annuelle de la maladie varie selon le pays de 2 à 20 cas pour 100000 habitants.

1.4.2. Hypothèses étiologiques de la maladie de Crohn

Beaucoup d'étiologies ont été proposées mais aucune n'a formellement été prouvée. Les plus fréquentes sont:

- ✓ Les causes génétiques: dans 35% des cas, les enfants nés de parents ayant cette maladie la développeront par la suite.
- ✓ Les causes immunitaires: il existerait, par exemple, une dérégulation de la réponse immunitaire à des antigènes exogènes communs, bactériens ou alimentaires présents dans le tractus digestif
- ✓ Les causes infectieuses: certains virus (la rougeole...) ou les mycobactéries. L'examen microscopique révèle souvent la présence de structures caractéristiques de la réaction immunitaire face à des corps étrangers ou des micro-organismes, souvent des mycobactéries.

En raison de similitudes cliniques et anatopathologiques entre la paratuberculose et la maladie de Crohn, *M.paratuberculosis* a été suspecté comme étiologie possible de cette maladie chez l'homme. Il existe cependant des différences très importantes, par exemple, la paratuberculose est une maladie très contagieuse et la paroi digestive de l'animal est généralement infiltrée par d'énormes quantités de mycobactéries (fréquemment on trouve 1 million de bacilles par gramme de tissu). Il n'existe pas non plus de liens épidémiologiques entre ces deux maladies; il y a plus de patients souffrant de la maladie de Crohn à la ville qu'à la campagne où se retrouvent pourtant les animaux malades. La Suède pourtant déclaré indemne de paratuberculose est l'un des pays européens où la maladie de Crohn est la plus fréquente.

Différents moyens d'identification sont mis en œuvre (culture, détection d'ADN...) afin de déterminer la présence de *M.paratuberculosis* dans les tissus de patients. Mais aucun résultat n'a permis d'en tirer des conclusions définitives, et le débat reste à ce jour ouvert (Fonteyne et *al.*, 1997).

De plus, si *M.paratuberculosis* est effectivement l'agent étiologique de la maladie de Crohn, le problème de la résistance de ce dernier à la stérilisation du lait va se poser. En effet, des études ont montré que *M.paratuberculosis* à une concentration supérieure à 10^1 bactéries/ml dans le lait n'est pas inactivé par des basses températures pendant un temps long (30 minutes à 63,5°C) ou par de hautes températures pendant un temps court (15 secondes à 71,7°C), ces conditions sont des méthodes de pasteurisation.

La comparaison du temps d'inactivation de *M.paratuberculosis* dans une solution de lactate par rapport à *M.avium* ou à *Listeria monocystogenes* montre que *M.paratuberculosis* est le plus thermorésistant: il faut à une température de 62°C, 52.3 secondes pour diminuer la quantité de *L.monocystogenes* viables d'un facteur de 10, 77.7 secondes pour *M.avium* et 139.3 secondes pour *M.paratuberculosis* (Sung et Collins, 1998).

1.5. Réponse immunitaire à l'infection de *M.paratuberculosis*

1.5.1. Cinétique de la réponse immunitaire

La réponse immunitaire contre *M.paratuberculosis* présente des similitudes à celle induite par d'autres mycobactéries comme *M.tuberculosis*.

Il est communément accepté que l'immunité protectrice contre les mycobactéries pathogènes est conférée par une réponse cellulaire et la diminution de celle-ci au profit de la réponse humorale va conduire l'animal vers la phase clinique de la maladie. La figure 8 présente un model simplifié de la réponse immunitaire consécutive à l'infection par *M.paratuberculosis*.

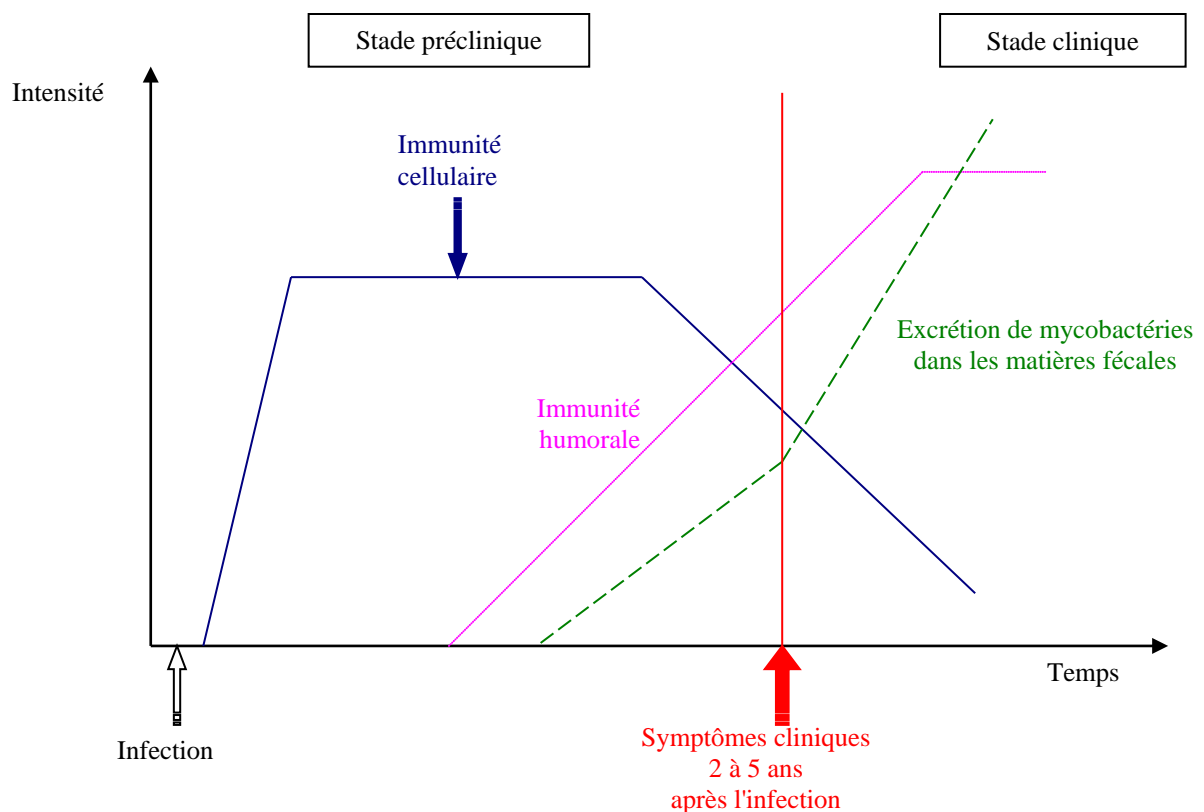


Figure 8: représentation schématique de l'évolution au cours du temps de la réponse immunitaire, de l'excrétion de germes dans les matières fécales et du statut clinique d'un animal infecté par *M.paratuberculosis* (Godfroid et Walravens, 1997).

La réponse cellulaire est capable de contrôler l'infection chez la plupart des animaux qui ne développeront jamais de signes cliniques. Lorsque cette réponse cellulaire diminue, les animaux vont progressivement excréter des mycobactéries dans les matières fécales et les symptômes cliniques vont apparaître.

Au début de l'infection, les macrophages naïfs vont être infectés et les cellules dendritiques vont être les principales cellules à activer les cellules T par présentation de l'antigène et la production de cytokines. Ces cellules T, constituées par les cellules T helper, les cellules T cytotoxiques et les cellules T $\gamma\delta$, sont très importantes dans l'activation des macrophages (Coussens, 2001).

Les cellules T helper:

Les lymphocytes CD4⁺ Tαβ appelés aussi les cellules T helper (Th) jouent un rôle majeur et leur principale action est la production de cytokines. Les Th sont divisées en deux groupes, les Th1 et les Th2. La balance entre ces deux populations est décisive pour le devenir de l'infection.

Le phénotype Th1 produit des cytokines comme l'interleukine Il-2, interféron IFN-γ (ce dernier a un rôle clé dans la résistance aux infections mycobactériennes), et le facteur nécrosant des tumeurs TNF-α. Le phénotype produit par la réponse Th1 est responsable du contrôle de l'infection mycobactérienne.

Les Th2 produisent les cytokines Il-4, Il-5, et Il-10. Ces cytokines induisent la production d'anticorps et sont associés à la progression de l'infection vers la maladie.

Les cellules T cytotoxiques:

Un autre groupe de lymphocytes T, les lymphocytes CD8⁺ Tαβ; souvent nommés les cellules T cytotoxiques, ont pour fonction la lyse de la cellule cible infectée et peuvent aussi sécréter des cytokines dont l'INF-γ en réponse aux antigènes mycobactériens.

Les cellules Tγδ:

Les bovins ont une autre population de cellules T appelées les cellules Tγδ représentant entre 30 et 80% des lymphocytes T circulants chez les veaux pour progressivement diminuer à 5% chez les adultes (contrairement à la souris et aux humains qui ont moins de 10% de ces lymphocytes) (Stabel, 2000). Ces cellules n'ont pas besoin d'interagir avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) pour être activées (Coussens, 2001).

Leur rôle est peu connu, mais ces cellules pourraient jouer un rôle dans les premières phases de l'infection (Stabel, 2000).

1.5.2. Cible de la réponse immunitaire

La majeure partie des recherches faites sur *M.paratuberculosis* concerne l'identification et la caractérisation d'antigènes pouvant être utilisés dans des tests diagnostiques.

L'antigène idéal pour le diagnostic présenterait les caractéristiques suivantes:

- ✓ Il serait unique à *M.paratuberculosis*.
- ✓ Il induirait une forte réponse immunitaire chez tous les animaux infectés.

Mais la plupart des antigènes découverts sont présents chez plusieurs mycobactéries. Ceci s'explique par la proximité génétique de l'ensemble des mycobactéries surtout entre *M.paratuberculosis* et *M.avium* (Harris, 2001). Ces deux mycobactéries ont des homologies de séquences de l'ADN génomique de 99% à 100% (Hurley *et al.*, 1988). Les principaux antigènes d'intérêt seront décrits brièvement dans ce chapitre.

Les protéines:

La recherche d'antigènes spécifiques à *M.paratuberculosis* pour le diagnostic ou la thérapie préventive a mené à la découverte de plusieurs protéines immunoréactives.

Les protéines de stress sont hautement conservées et trouvées chez les eucaryotes et les procaryotes. La synthèse de ces protéines est fortement augmentée après l'exposition à un stress comme la température. Des homologues de DnaK, GroEL et GroES d'*E.coli* ont été identifiés et caractérisés chez *M.paratuberculosis* et *M.avium*. Ce sont des protéines qui produisent de fortes réponses immunitaires cellulaires et humorales, elles sont testées pour des vaccins mais ne conviennent pas pour le diagnostic (Harris 2001).

Le complexe antigénique A36 contient 30 protéines de 20 à 90 kDa. Celles comprises entre 28 et 45 kDa induisent des réponses immunitaires cellulaires et humorales fortes. Une protéine de ce complexe de 34kDa contenant 3 peptides dont le a362 pourrait être spécifique de *M.paratuberculosis*. L'intérêt diagnostique de ce peptide n'a pas encore été complètement évalué (Cocito *et al.*, 1994).

Le complexe A85 constitué de 4 protéines sécrétées. Il est retrouvé chez *M.tuberculosis*, *M.bovis* et *M.paratuberculosis*. Il provoque une forte réponse cellulaire et est un candidat potentiel pour la production d'un vaccin. Son utilisation éventuelle en diagnostic n'est pas possible puisqu'il n'est pas spécifique de *M.paratuberculosis* (Olsen *et al.*, 2002).

Le MPP14 n'a pas de fonction connue. Il a été purifié chez *M.paratuberculosis* et trouvé chez *M.avium*, *M.intracellulare* et *M.scrofulaceum*. Cet antigène est intéressant puisque c'est le premier qui permet de distinguer *M.paratuberculosis* de *M.bovis* par un test ELISA (Olsen *et al.*, 2002).

Une protéine de 35kDa de fonction inconnue, est présente chez *M.avium*, *M.intracellulare* et *M.paratuberculosis*, elle provoque une réponse humorale (Harris et Barletta, 2001).

L'AhpC et l'AhpD sont des enzymes de détoxification importantes dans la protection contre des métabolites nitriques et oxydants. Ces protéines induisent une très forte réponse INF- γ et permettent de faire la distinction entre une infection à *M.bovis* et *M.paratuberculosis* (Olsen *et al.*, 2002; Harris et Barletta, 2001).

Les glycolipides:

Les complexes lipidiques de la pseudo-capsule sont classés en deux groupes biologiques: ceux qui sont inactifs et ceux qui sont actifs. Le premier groupe comprend par exemple les phthiocérols dimycocerasates et les glycopeptidolipides apolaires, le second comprend des complexes actifs comme des glycolipides phénoliques, des glycopeptidolipides polaires, et des lipooligosaccharides (Minnikin, 1991).

Le LAM est un antigène B immunodominant, réagissant fortement avec les sérums des animaux paratuberculeux. Mais il existe un grand nombre de réactions croisées avec les sérums des animaux sensibilisés par des mycobactéries environnementales (Olsen *et al.*, 2002).

Comme c'est un antigène B immunodominant il est intéressant de développer des tests de diagnostic utilisant le LAM.

Il a été montré que le LAM est chimiotactique pour les cellules immunitaires T et il intervient dans la suppression locale de l'action de ces dernières (Strohmeier et Fenton, 1999).

Il a d'autres activités sur le système immunitaire comme l'inhibition de la présentation de l'antigène par les cellules présentatrices, l'inhibition de l'activation des macrophages par l'interféron- γ (McNeil et Brennan, 1991; Besra et Chartejee, 1994).

L'équipe du Dr.Kapur a déterminé la séquence nucléotidique quasi complète d'une souche de *M.paratuberculosis*. Le génome de cette mycobactérie a une taille de 4.92 Mb et il est composé de 5178 cadres ouverts de lecture. La comparaison des séquences de *M.paratuberculosis* avec celles de *M.avium* a permis de définir des séquences qui semblent unique à *M.paratuberculosis*. 27 séquences ont été trouvées et plusieurs de ces séquences pourraient servir comme outils de diagnostic (Kapur *et al.*, 2002).

1.6. Tests de diagnostic

Il existe deux approches principales de diagnostic, la première est de trouver l'agent pathogène et la seconde est de mettre en évidence une réponse immunitaire (Manning et Collins, 2001). Les tests de diagnostic sont caractérisés par leur sensibilité (proportion d'animaux testés positifs parmi une population totale d'animaux infectés), et leur spécificité (proportion d'animaux testés négatifs parmi une population d'animaux négatifs). La figure 9 présente les techniques qui seront développés dans ce chapitre.

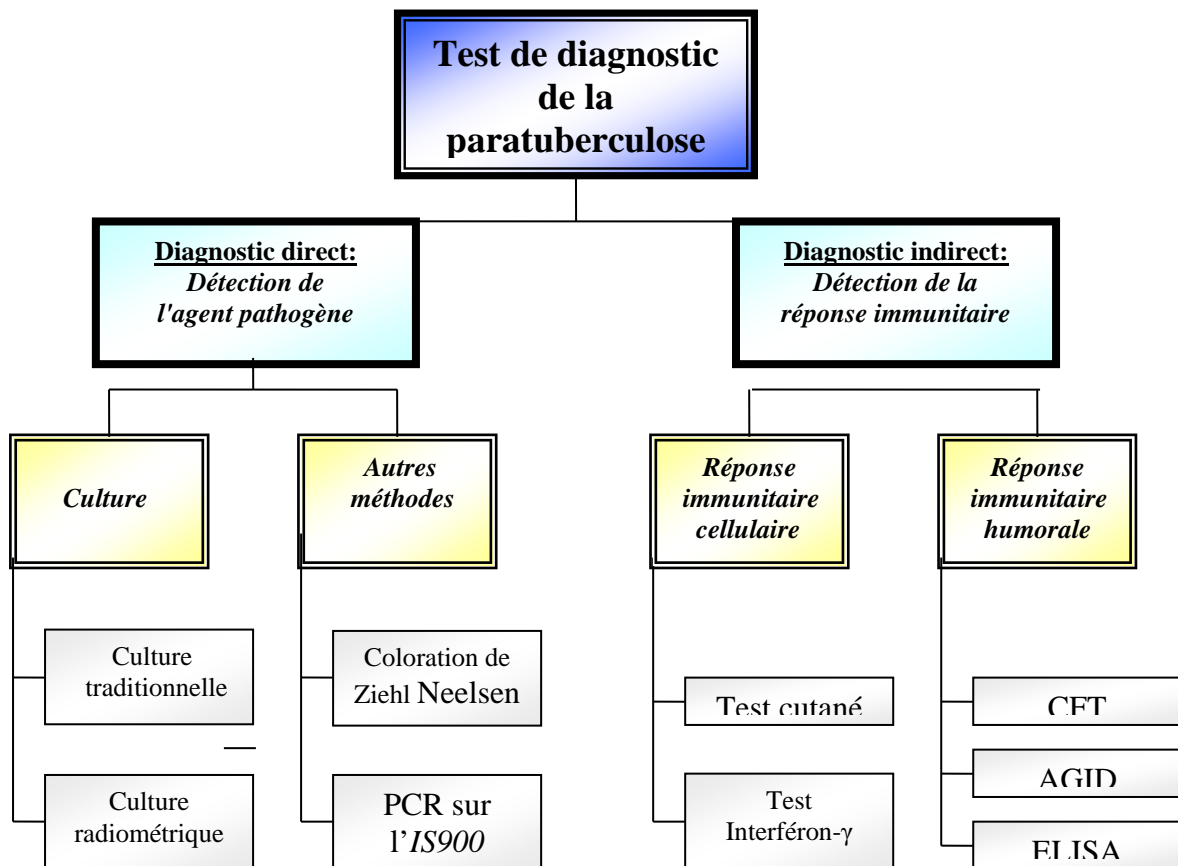


Figure 9: présentation générale des différentes techniques de diagnostic directes et indirectes.

1.6.1. Diagnostic direct

➤ Culture à partir d'échantillons de matières fécales ou de tissus provenant d'organes

La culture à partir des matières fécales ou d'organes représente la technique standard la plus utilisée. L'ensemencement se fait sur deux milieux de culture riches et contenant de l'œuf avec ou sans Mycobactine J. L'apparition de colonies visibles à l'œil nu, prend de 8 à 16 semaines. La présence de colonies seulement sur les milieux contenant la mycobactine permet l'identification de *M. paratuberculosis*. Le principal inconvénient de cette technique est que les résultats ne sont connus que lorsque les colonies sont visibles.

Une autre méthode de culture qui permet de détecter des métabolites marqués au C^{14} , permet une détection entre 5 à 8 semaines ; il s'agit de culture dite radiométrique (Manning et Collins, 2001). La sensibilité d'une culture classique est estimée entre 30 et 50% en fonction de la préparation des matières fécales. On estime la spécificité de cette méthode à 100% (Whitlock *et al.*, 2000).

➤ **Coloration de Ziehl Neelsen**

Cette coloration se base sur la propriété d'acido-alcool-résistance des mycobactéries qui apparaissent rouges et elle peut se faire à partir d'échantillons de matières fécales ou de tissus intestinaux. La figure 10 montre une coloration de Ziehl Neelsen à partir d'une section d'un iléon infecté par *M.paratuberculosis*.

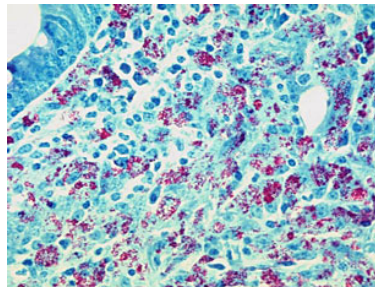


Figure 10: mise en évidence de *M.paratuberculosis* (en rouge) par la coloration de Ziehl Neelsen d'une section de l'iléon. Ces mycobactéries se développent par grappe à l'intérieur des macrophages (Photo: Faculté de Médecine Vétérinaire du Wisconsin).

La sensibilité de cette méthode est très faible et ne permet pas de distinguer entre les différentes espèces de mycobactéries pathogènes et non pathogènes ainsi que d'autres organismes très proches comme *Norcadia sp.* et *Corynebacterium sp.* Un résultat négatif ne permet pas de conclure à l'absence de *M.paratuberculosis*, toutefois, il s'agit d'une technique très utilisée et qui donne une première indication (Manning et Collins, 2001).

➤ **PCR (Polymerase Chain Reaction) basée sur l'IS900**

La PCR basée sur la séquence d'insertion *IS900* est utilisée pour confirmer l'identification des mycobactéries isolées des échantillons. L'application aux échantillons biologiques est gênée par la présence d'inhibiteurs de la PCR présents dans ces derniers.

Les techniques de détection basées sur l'utilisation de sondes nucléiques sont beaucoup plus rapides que la culture mais elles sont aussi extrêmement coûteuses. Leur sensibilité est toujours considérée inférieure à la culture, ce sont des techniques qu'il reste à optimiser (Godfroid *et al.*, 1997).

1.6.2. Diagnostic indirect

➤ Réponse immunitaire cellulaire

Deux tests principaux sont utilisés: test cutané (*in vivo*) et le test interféron- γ (*in vitro*).

Le test cutané:

Le test cutané se base sur une réaction de type hypersensibilité retardée, il y a apparition dans un délai de 24 à 72 heures d'un gonflement à l'endroit de l'injection. Les antigènes utilisés sont principalement la tuberculine aviaire ou la johnin.

Ce test n'est pas recommandé chez les jeunes animaux à cause de sa faible spécificité. Ce test a été utilisé avec succès dans le cadre d'un programme de contrôle de la tuberculose bovine due à *M.bovis* mais semble plus difficile à interpréter dans le cadre du diagnostic de la paratuberculose (Manning et Collins, 2001).

Le test interféron- γ :

L'interféron- γ est une cytokine produite par les lymphocytes T lors de la réponse cellulaire, elle est détectée grâce à un ELISA (Manning et Collins, 2001).

Le test de l'interféron- γ repose sur la stimulation pendant 18 heures des cellules présentes dans le sang par des antigènes. Les antigènes utilisés dans le cadre du diagnostic de la paratuberculose sont PPD bovis et PPD avium. Le surnageant des cellules est testé par un ELISA. Afin d'interpréter les résultats, le rapport des valeurs obtenues est effectué: valeur PPD bovis/valeur PPD avium. Lorsque ce rapport est inférieur ou égal à 0.7, le résultat est indicatif d'une infection par *M.paratuberculosis*. Si ce rapport est supérieur ou égal à 2, le résultat est indicatif d'une infection par *M.bovis*. Et enfin si ce rapport se situe entre ces deux valeurs (0.7 et 2) le résultat est indicatif d'une sensibilisation par des mycobactéries environnementales.

La spécificité de ce test est relativement basse à cause des réactions croisées et il ne peut être utilisé dans des programmes de surveillance (Olsen *et al.*, 2002).

➤ Réponse immunitaire humorale

Il existe trois tests standard pour la détection des anticorps: l'immunodiffusion en gel d'agarose (AGID), le test du fixation du complément (CFT) et l'enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Souvent les antigènes des ELISA ou des AGID sont des lysats bruts de *M.paratuberculosis*.

L'identification et l'utilisation d'antigènes spécifiques excrétés ou faisant partie de la paroi cellulaire pourra augmenter les performances de ces tests (Manning et Collins, 2001; Olsen *et al.*, 2002).

Le CFT:

Le test est basé sur la capacité du complément à se fixer normalement au complexe antigène-anticorps. Si l'échantillon n'apporte pas d'anticorps réagissant avec l'antigène que l'on choisit, le complément est alors libre de réagir avec un système indicateur (des globules rouges de moutons sensibilisés) provoquant la lyse de ce dernier; le test est alors négatif. S'il y a formation d'un complexe antigène-anticorps, alors il n'y a pas de lyse mais la formation d'un culot; le test est alors positif.

Il s'agit d'un test qui a été souvent utilisé et qui est encore recommandé par l'OIE (Office International des Epizooties) pour le commerce des animaux, mais ses qualités intrinsèques (sensibilité et spécificité) sont moins performantes que celles de l'AGID et de l'ELISA absorbé (Manning et Collins, 2001).

L'AGID:

Ce test détecte les anticorps présents dans le sérum. Son principe est la diffusion du sérum et de l'antigène mis séparément dans deux puits côte à côte dans une gélose. S'il y a présence d'anticorps spécifiques de cet antigène, il y a formation d'un précipité qui est visible à l'œil. Le test a été utilisé avec succès dans des programmes de contrôle de la maladie pour les bovins, les chèvres et les moutons. Toutefois l'AGID a une sensibilité moindre que l'ELISA pour les bovins mais pour la surveillance des moutons, la sensibilité est comparable (Manning et Collins, 2001).

L'ELISA absorbé:

Le principe de cette technique est la sensibilisation à l'aide d'antigènes de *M.paratuberculosis* sur une surface solide. Les échantillons absorbés par des antigènes de *M.phlei* sont alors déposés sur la plaque sensibilisée (Crowther, 1995). Un système d'amplification et de révélation permettra de détecter les anticorps qui auront réagi avec l'antigène de *M.paratuberculosis*.

La spécificité de ce test est augmentée par l'étape d'absorption avec des antigènes de *M.phlei*. Cette étape réduit les faux positifs, dus aux réactions croisées entre des anticorps produits contre des mycobactéries environnementales et ceux produits contre des antigènes de *M.paratuberculosis* (Manning et Collins, 2001).

Ce test est plus sensible que l'AGID et le CFT (Manning et Collins, 2001). Sa sensibilité varie de 10 à 75%, elle est très dépendante de la phase de l'infection dans lequel se trouve l'animal, la spécificité de ces ELISA absorbés est estimée de 99 à 99.9% (Whitlock *et al.*, 2000).

Au niveau des préparations d'antigènes utilisés, on trouve souvent des extraits bruts de mycobactéries de l'espèce choisie et des préparations plus fines comme le LAM (Harris et Barletta, 2001).

1.6.3. Applications diagnostiques

Celles-ci sont variables et chacune d'elles fait appel à un test répondant à des caractéristiques particulières (sensibilité, spécificité, vitesse d'exécution, coût, facilité d'utilisation etc.).

Ces applications sont:

- ✓ La confirmation d'un cas clinique.
- ✓ L'estimation de la prévalence.
- ✓ Le contrôle de la maladie au sein d'une exploitation infectée.
- ✓ La certification et classification d'un troupeau.
- ✓ Le contrôle du commerce des animaux (Minnikin, 1991; Godfroid *et al.*, 1997).

La situation dans laquelle le diagnostic est demandé doit être considérée ainsi que les conséquences d'un résultat positif ou négatif.

Les tests de diagnostic de la paratuberculose actuellement disponibles possèdent une excellente spécificité (supérieure à 99%) mais leur sensibilité varient en fonction de l'évolution de l'infection. Les tests sérologiques offrent un maximum de sensibilité lorsque les symptômes cliniques se développent (Godfroid *et al.*, 1997).

La principale difficulté de diagnostic se trouve chez les animaux asymptomatiques car l'excrétion des mycobactéries et les réponses aux tests immunologiques peuvent varier (Olsen *et al.*, 2002).

1.7. Prévention et contrôle de la paratuberculose

1.7.1. Traitement

Actuellement les médicaments ne sont utilisés que dans le cas où l'on voudrait prolonger la vie de l'animal ayant une valeur particulière. Les traitements les plus utilisés sont la clofazimine, l'isoniazide, la rifampicine et l'ethambutol qui sont prescrits pour le traitement de la tuberculose humaine (à *M.tuberculosis*). Dans tous les cas, ils ne permettent pas de guérir l'animal et ne sont pas recommandés, car ces traitements sont utilisés en médecine humaine (Olsen *et al.*, 2002).

1.7.2. Prophylaxie

Dans un troupeau infecté, la paratuberculose peut être contrôlée. Cela nécessite une bonne connaissance de la maladie, ainsi que la coopération du fermier, du vétérinaire et l'aide du laboratoire. Un programme de contrôle prend énormément de temps, plusieurs années. Les principes de base sont simples, d'une part prévenir les nouvelles infections et d'autre part, identifier les animaux infectés et les éliminer.

Les différents points à contrôler sont:

1. La détection et l'élimination de certains animaux asymptomatiques parmi ceux classés positifs par les tests indirects, en particulier l'ELISA. Ils devront être éliminés à terme ou tout au moins séparés des autres animaux. Les animaux qui présentent les signes cliniques de la paratuberculose devront être éliminés immédiatement.
2. La gestion du fumier: il constitue le réservoir principal du germe. Sa gestion est donc importante, il est nécessaire d'empêcher le contact des jeunes veaux avec les matières fécales le plus longtemps possible. De plus la contamination par épandage sur les pâturages est théoriquement possible mais à une signification épidémiologique de moindre importance.
3. La gestion du lait et du colostrum: l'excrétion des mycobactéries dans ces derniers se produit chez des animaux avec ou sans symptômes cliniques. Le colostrum est une source d'infection qui peut être considérablement réduite en utilisant du colostrum d'animaux classés négatifs, en évitant de les regrouper et en nettoyant le pis de la vache avant la récolte.
4. La désinfection: *M.paratuberculosis* est résistant à la plupart des désinfectants couramment utilisés, il requiert un nettoyage à l'aide d'un désinfectant tuberculicide.
5. La vaccination (Godfroid *et al.*, 1997), cf. chapitre suivant.

Beaucoup de pays ont initié des programmes de contrôle ou d'éradication de la maladie pour enrayer la propagation de l'infection et augmenter le nombre de troupeaux sains.

Le commerce national et international rend ce travail difficile, les principaux obstacles étant la longue incubation de l'infection, les animaux en phase asymptomatique et la faible sensibilité des méthodes de diagnostic qui s'elles permettent de déterminer le statut des troupeaux n'offrent que peu de garantie pour le diagnostic individuel lors des échanges commerciaux (Olsen *et al.*, 2002).

1.7.3. La vaccination comme moyen de lutte

Des vaccins contre la paratuberculose sont commercialement disponibles et ont été évalués. Les vaccins inactivés ou vivants ont été utilisés avec un succès relatif dans plusieurs pays en réduisant les animaux excréteurs. Le tableau 1 décrit les vaccins qui ont été utilisés depuis les dix dernières années.

Effet du vaccin sur:				
Type de vaccin	Animal et nombre dans l'étude	Voie d'inoculation et doses administrées	Signe clinique	Evidence de la réponse immunitaire
<i>Inactivé à la chaleur (souche 18)</i>	Bovin (20)	Non reporté.	Non reporté.	Les anticorps chez les animaux vaccinés sont détectables de 2 à 15 mois.
<i>Inactivé à la chaleur (souche 5889 Bergey)</i>	Bovin (866)	25-100mg (poids sec) en intramusculaire.	Protection partielle; diminution de l'excrétion de mycobactéries.	Augmentation du titre des anticorps.
<i>Vivant atténué (316F)</i>	Mouton (580)	5 mg (poids sec) en sous-cutané.	Protection partielle; le nombre d'animaux présentant des symptômes cliniques diminue.	Non reporté.
<i>Inactivé à la chaleur (Lelystad)</i>	Bovin (176)	5 mg en sous-cutané.	36 animaux sur les 176 ont une culture positive avec des lésions histologiques et 2 ont une culture négative avec des lésions.	Les animaux vaccinés mais non infectés (126/176) ont une réponse DTH positive.
<i>Vivant atténué (316F)</i>	Mouton (17)	10 ³ CFU en sous-cutané.	Protection partielle, diminution de la sévérité des lésions histologiques de l'intestin.	Les animaux vaccinés montrent une forte réponse anticorps dès la première semaine.
<i>Inactivé à la chaleur (souche 5889 Bergey)</i>	Bovin (866)	25-100mg (poids sec) en intramusculaire.	Protection partielle, réduction de l'excrétion.	Les animaux vaccinés montrent une augmentation de leur titre anticorps durant les 3 premières années puis une diminution jusqu'à la cinquième année.
<i>Inactivé à la chaleur (Lelystad)</i>	Bovin (499)	5 mg en sous-cutané.	Protection partielle, diminution d'animaux en phase clinique et d'animaux positifs en histologie.	Non reporté.
<i>Vivant atténué (316F)</i>	Chèvre (20)	Non reporté.	Non reporté.	La vaccination induit une réponse cellulaire mesurée par la prolifération des lymphocytes.
<i>Inactivé à la chaleur</i>	Bovin (652)	Non reporté.	Protection partielle, Réduit le nombre d'animaux en phase clinique.	Non reporté.
<i>Inactivé à la chaleur et Vivant atténué (316F)</i>	Bovin (28)	1.5 ml de vaccin vivant atténué ou 1 ml de vaccin inactivé en sous-cutané.	Protection partielle.	3 animaux vaccinés ont un test ELISA +, indiquant la production d'anticorps et tous les animaux ont au moins une fois un test INF-γ positif.
<i>Vivant atténué (316F)</i>	Mouton (41)	1 ml en sous-cutané.	Protection partielle diminution du nombre d'animaux présentant des lésions histologie ou d'animaux positifs en PCR.	Les moutons vaccinés présentent une plus forte réponse INF-γ et une production d'anticorps que les non-vaccinés.

Tableau 1: présentation des vaccins étudiés pendant les dix dernières années (Harris et Barletta, 2001).

La vaccination ne permet pas à elle seule d'éradiquer la maladie, l'environnement est très important et le respect des règles décrites plus haut peut s'avérer aussi efficace que la vaccination (Cocito *et al.*, 1994).

De plus la vaccination interfère avec les tests de diagnostic de la paratuberculose mais aussi de la tuberculose bovine (*M.bovis*). Il existe des effets secondaires comme la formation de granulome au point de vaccinations (figure 11).

Il existe un risque pour le vétérinaire de se blesser accidentellement lors de l'administration du vaccin.

Enfin, il faudrait pouvoir identifier des animaux vaccinés de ceux infectés et actuellement ce n'est pas le cas. Une des voies possible pour y arriver serait d'utiliser des antigènes dans les tests de diagnostic différents de ceux utilisés dans la vaccination (Olsen *et al.*, 2002; Harris et Barletta, 2001).



Figure 11: cette photo montre la réaction d'un bovin à la suite d'une vaccination. Le vaccin utilisé a été conçu à partir de mycobactéries inactivées. Au site d'injection de ce dernier apparaissent des granulomes pouvant dégénérer en abcès (Photo: Faculté de Médecine vétérinaire du Wisconsin).

2. Objectifs du mémoire

Ce sujet de stage a été proposé dans le cadre d'un projet DG-6 intitulé "Développement d'outils de diagnostic et de prophylaxie médicale pour le contrôle de la maladie de la paratuberculose bovine".

Deux approches ont été utilisées:

- ❖ La détection d'anticorps polyclonaux dans les échantillons.
- ❖ La production d'anticorps monoclonaux dirigé contre le LAM de *M.paratuberculosis*.

2.1. Détection d'anticorps polyclonaux dans les échantillons

2.1.1. Développement du test ELISA LAM à appliquer aux colostrums

Le colostrum est la première sécrétion épaisse, crémeuse et jaunâtre récoltée du pis après le vêlage. Par définition, seule la sécrétion de la première traite s'appelle colostrum. La sécrétion de la deuxième à la huitième traite s'appelle le lait de transition dont la composition devient graduellement celle du lait.

En plus de sa valeur nutritionnelle élevée, le colostrum contient aussi des anticorps nécessaires à la protection du nouveau-né contre de nombreuses infections.

Les anticorps lors de la gestation ne peuvent pas passer la barrière placentaire, les nouveau-nés sont donc très sensibles aux infections. Ces derniers absorbent principalement les anticorps par la paroi intestinale lors des 24 premières heures de vie (D'après Goddeeris, 1998).

Le colostrum est une voie principale de transmission de la maladie de Johne de la vache à son veau, l'isolement de *M.paratuberculosis* dans le colostrum ayant été mis en évidence. Apparemment les anticorps présents dans le colostrum n'ont pas d'effet protecteur vis à vis de *M.paratuberculosis* (Streeter *et al.*, 1995). Il est intéressant de pouvoir contrôler cette voie de transmission par l'intermédiaire de test sur le colostrum et au point de vue pratique, le fermier lui-même peut effectuer les prélèvements.

De plus, il existe des banques de colostrum chargées de récolter du colostrum dans les fermes productrices et par la suite de les redistribuer dans des fermes où il en manque. Le colostrum subit une variété de tests dans ces banques et L'ELISA LAM mis au point pourrait être rajouté à ces derniers dans un but de certification.

2.1.2. Comparaison de l'ELISA LAM avec deux ELISA commerciaux (Pourquier et IDEXX)

L'objectif de ce chapitre est de comparer les résultats obtenus avec l'ELISA LAM, l'ELISA de la firme IDEXX et l'ELISA de la firme Pourquier grâce à des tests statistiques. En fonction des résultats de ces tests statistiques, nous pourrions avoir une idée des caractéristiques intrinsèques (sensibilité et spécificité) de l'ELISA LAM connaissant les caractéristiques intrinsèques des deux autres ELISA commerciaux.

2.2. Production et caractérisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre des épitopes de surface du LAM.

Les objectifs de cette fusion sont la production d'anticorps monoclonaux contre le lipoarabinomannan (LAM) de *M.paratuberculosis* et l'analyse de la réactivité de ces anticorps monoclonaux sur le LAM de différentes mycobactéries.

L'obtention de ces anticorps monoclonaux permettrait une analyse antigénique du LAM de *M.paratuberculosis*: il existe en effet différents épitopes (domaine antigénique) hétérogènes chez les mycobactéries: certains épitopes sont communs entre les mycobactéries et d'autres plus spécifiques de mycobactéries pathogènes et éventuellement d'une espèce et même d'une sous-espèce comme *M.avium* subsp. *paratuberculosis*. C'est pourquoi il est intéressant de tester la réactivité de ces anticorps monoclonaux contre le LAM de mycobactéries proche de *M.paratuberculosis* comme *M.avium* et *M.bovis* et des mycobactéries environnementales comme *M.phlei*, *M.smegmatis*, *M.vaccae*.

Ces anticorps pourraient servir à la détection des mycobactéries dans les matières fécales à l'aide de techniques immunologiques. Ces techniques nécessitent des anticorps de haute affinité dirigés contre des antigènes spécifiques de *M.paratuberculosis* exprimés à la surface de la bactérie. De plus, les anticorps anti-LAM spécifiques pourraient être utilisés dans le cadre du développement d'un test sérologique de type ELISA de compétition.

3. Matériels et méthodes

3.1. Souches utilisées

Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis (*M.paratuberculosis*): ATCC 19698.

Mycobacterium phlei: souche du laboratoire.

3.2. Sérums utilisés

Différents sérums ont été utilisés :

✓ **Les sérums positifs:**

Le sérum positif De Keyser, sérum positif (++), provient d'un animal infecté expérimentalement par voie intraveineuse par *M.paratuberculosis*.

Le sérum positif 45, sérum positif (+), provient d'un animal infecté naturellement.

Le titre en anticorps du sérum positif (++) est supérieur à celui du sérum positif (+).

✓ **Le sérum négatif 7658:** sérum négatif, provient d'un animal n'ayant pas été infecté ou immunisé par *M.paratuberculosis*. Cet animal appartient à une exploitation indemne de tuberculose bovine et ne présente aucune évidence connue d'infection par *M.paratuberculosis*. Cet animal a également été testé négatif à plusieurs reprises lors de tests de diagnostic.

✓ **Le sérum 5174:** sérum *M.phlei*, provenant d'un animal immunisé par *M.phlei*.

3.3. Protocole d'extraction du LAM

(Jark *et al.*, 1997)

Première étape:

Décongeler les mycobactéries ou les prélever directement à partir du milieu de culture.

Centrifuger à 3000g pendant 10 minutes.

Peser le culot et resuspendre les bactéries à raison de 0.6g de bactérie /ml d'eau distillée.

Inactiver les mycobactéries pendant 10 minutes à 100°C.

Deuxième étape:

Passer les mycobactéries inactivées 2 à 4 fois à la presse de French, 15000 psi.

Garder le lysat à -20°C jusqu'à utilisation.

Troisième étape:

Décongeler le tube.

Centrifuger 15 minutes à 15000g (garder si nécessaire tout le culot bactérien pour analyse et pour immunisation des souris).

Pré-incubation de la protéinase K :

Ajouter la protéinase K à raison de 1 mg pour 1 g de mycobactérie dans un volume de tampon de réaction concentré 2 fois (volume équivalent au volume du surnageant).

Incuber pendant 15 minutes à 37°C.

Digestion par la protéinase K :

Ajouter cette protéinase K pré-incubée au surnageant.

Incuber pendant 1 heure à 37°C.

Dénaturer la protéinase K en incubant le mélange pendant 5 minutes à 100°C.

Centrifuger 15 minutes à 15000g.

Quatrième étape:

Prélever le surnageant et filtrer le sur un filtre de 0.45 µm (récupérer un échantillon pour analyse).

Filtrer sur un centricon 30 000. YM-30 :

Centrifuger le centricon 30 avec 10 ml d'eau à 3000g pour réhydrater la membrane.

Centrifuger le centricon 30 avec le filtrat obtenu précédemment (volume adéquat pour ne pas boucher le filtre) à 3000g. Lorsque la majorité de la solution est passée, rajouter du PBS stérile.

Pour récupérer le LAM, centrifuger le centricon 30 à l'envers à 3000g.

Remarque: le temps de centrifugation dépend du volume que l'on veut obtenir.

Récupérer le LAM concentré et le stocker à -20°C

Tampon de réaction de la protéinase K (concentré 2 fois): Tris HCl 20 mM à pH7.8, EDTA10 mM, SDS 1%.

3.4. Electrophorèse en conditions dénaturantes SDS-PAGE

Préparation des échantillons:

Ajouter 4 µl de bleu de Laemmli (concentré 5 fois) à 16 µl d'échantillon, faire bouillir 10 minutes au bain-marie.

Déposer doucement les échantillons dans les puits du gel.

Composition du bleu Laemmli : Tris-HCL (pH 6.8) 125 mM, SDS 4%, β-mercaptoéthanol 4%, glycérol (87%) 10%, bleu de bromophénol 0.2% et H₂O.

Composition des gels:

Gel de concentration

Réactifs	Concentrations finales
Tris HCL, pH=6.8 à 1.5 M	0.125 M (v/v)
* Acryl/bis 40%	4% (v/v)
SDS 10%	0.1% (v/v)
APS 10%	0.05% (v/v)
Temed	0.1% (v/v)

Gel de migration

Réactifs	Concentrations finales
Tris HCL, pH=8.8 à 1.5 M	0.375 M (v/v)
* Acryl/bis 40%	10% ou 12% ou 15% (v/v)
SDS 10%	0.1% (v/v)
APS 10%	0.05% (v/v)
Temed	0.8% (v/v)

* Acryl/bis à 40%: mélange acrylamide/ bis-acrylamide dans un rapport 37.5:1.

Migration:

Ampérage à 40 mA pour un gel.

Après migration, le gel peut être soit transféré sur une membrane pour un Western blot ou être directement coloré au bleu de Coomassie.

Tampon de migration 10× pH: 8.3: Tris-base 25 mM, Glycine 192 mM, SDS 0.1% (p/v).

Coloration au bleu de coomassie:

Mettre le gel à tremper dans du bleu de coomassie pendant approximativement 10 h jusqu'à obtention d'une coloration intense du gel.

Le gel est ensuite décoloré dans une solution de décoloration.

Composition: bleu de coomassie: 50% (v/v) de méthanol pur, 10% (v/v) d'acide acétique pur, environ 0.5 g/l de bleu de coomassie G250 LKB Bromma, compléter avec de l'eau distillée.

Composition de la solution de décoloration: 50% (v/v) de méthanol pur, 10% (v/v) d'acide acétique pur, compléter avec de l'eau distillée.

Western blot

Transfert sur membrane parablot Nyamp (Macherey-nagel).

La membrane Nyamp/Nyplus est immergée dans du méthanol 100% quelques minutes puis placée dans le tampon de transfert.

9 couches de papier filtre Whatmann préalablement immergés dans le tampon de transfert sont déposés sur l'électrode positive.

Déposer la membrane sur les papiers Whatmann imbibés de tampon de transfert.

Placer le gel de polyacrylamide sur la membrane.

Puis placer sur le gel 9 autres couches de papiers filtre préalablement immergés dans le tampon de transfert.

Effectuer le transfert sous un courant de 0.8 mA par cm² de membrane pendant 1 heure.

Tampon de transfert: 25 mM Tris base, 192 mM glycine pH 8.3, 20% méthanol.

Coloration au Rouge Ponceau

Après transfert, la membrane est immergée dans une solution de rouge ponceau pour vérifier la présence de protéines et donc le bon déroulement du transfert.

Elle est ensuite rincée à l'eau pour éliminer toute trace de colorant.

Remarque: Le rouge ponceau n'interfère pas avec la détection par les anticorps.

Révélation par des anticorps

Saturation:

La membrane est placée dans une solution de saturation et incubée une nuit à 4°C ou 2 h sous agitation à température ambiante.

Anticorps primaire:

Ajouter le sérum contrôle (++) (cf. chapitre 3.2.) dilué dans le tampon de saturation à 1/100.

Incuber 1h à température ambiante sous agitation.

Lavages:

3 lavages de 10 minutes avec du TTBS + 2% HC (hydrolysate de caséine).

Conjugué:

Ajouter le conjugué: la protéine G, diluée 1/2000 en TTBS + 1% HC pour détecter des anticorps de bovins. Incuber 1h à température ambiante sous agitation.

Lavages:

3 lavages de 10 minutes avec du TTBS + 2% HC.

Révélation:

La membrane est immergée dans une solution de révélation jusqu'à apparition des bandes.

La révélation est stoppée en rinçant la membrane avec de l'eau distillée.

Composition des solutions:

TTBS: 100 ml Tris 1 M (pH 7.5), 9 g NaCl, 1 ml Tween20.

Solution de lavage : TTBS + HC 2% (v/v).

Solution de saturation: TTBS + HC 10% (v/v).

Solution de révélation : 6 µl H₂O₂, 100 µl NiCl₂, 2 ml TrisHCl 1 M (pH 7.5), 400 µl DAB pour 20 ml (DAB: 3,3'-diaminobenzidine, Sigma n°:D5637).

Rincer la membrane à l'eau.

Marqueur de poids moléculaire:

Low-range Marker Roche cat. n° 1 495 984 (pour le gel au bleu de coomassie).

Prestained Protein Marker, Broad Range, BioLabs P 7708S (pour le western blot).

Préparation de la solution d'hydrolysate de caséine (HC):

La concentration finale de la solution d'hydrolysate de caséine (Fluka référence 22078) est de 25g/L. Diluer 25 g de caséine dans 800 ml de NaOH à 0.3 M, laisser une nuit sous agitation, et le lendemain amener le pH à 7 avec du HCl concentré et porter la solution à un litre. Centrifuger 20 minutes à 700g, aliquoter et congeler à -20°C. Cette solution servira pour toutes les autres méthodes.

3.5. Préparation des échantillons de colostrums

Deux types de préparation des colostrums ont été employés.

Écrémage:

Prendre un volume de colostrum (nous avons travaillé avec 2 ml). Centrifuger 30 minutes à 8000g.

Après centrifugation, nous obtenons trois phases: une phase en surface (la crème), une phase intermédiaire et le culot.

La phase intermédiaire est prélevée et transférée dans un autre tube stérile afin d'être utilisée pour les tests ELISA.

Le culot et la crème sont mélangés et conservés pour être mis en culture pour la recherche de *M.paratuberculosis*.

Traitement à la présure:

Le colostrum est écrémé comme indiqué précédemment et la phase intermédiaire est soumise à un traitement à la présure.

Ajouter 4% (v/v) de présure végétale sur le colostrum écrémé (la présure est à 520 mg de chymosine active/ml, la HUMEAU, France).

Incuber 3h à 37°C.

Centrifuger 15 minutes à 1200g.

Récupérer le lactosérum et éliminer le caillot qui s'est formé.

3.6. Ensemencement des milieux de culture HEYM

L'ensemencement s'effectue à partir du culot et de la crème obtenue après l'écrémage (cf. chapitre 3.5).

Décontamination:

Pour un volume de mélange « culot et crème » obtenu lors de l'étape de l'écrémage, ajouter 10 volumes de HPC à 0.75% (p/v) (cétypyridinium chloride).

Mélanger et laisser une heure à température ambiante.

Centrifuger 20 minutes à 700g.

Ensemencement des milieux de culture HEYM(Herrold's Egg Yolk Medium):

Après centrifugation, nous obtenons à nouveau 3 phases, la crème se trouvant en haut, le culot et la phase intermédiaire contenant l'HPC. A l'aide d'une anse, introduire de la crème dans un premier milieu HEYM contenant de la mycobactine J, et dans un autre n'en contenant pas. Introduire quelques gouttes de sérum physiologique afin d'assurer une humidification suffisante.

Jeter le liquide contenant l'HPC et garder le culot.

Reprendre le culot dans la quantité de sérum physiologique occupant la partie conique d'une pipette pasteur. Introduire la moitié dans le premier milieu et l'autre moitié dans le second milieu.

Incuber tous les milieux HEYM à 39°C pendant 6 mois.

Composition du milieu de culture HEYM:

Peptones	4.5 g/l
Pyruvate de Na	2.05 g/l
NaCl	2.25 g/l
Extrait de boeuf Difco	1.35 g/l
Mycobactin J	1 mg/l
Solution vert malachite à 2% (p/v)	2.55 ml/l
Glycérol	13.5 ml
Agar noble	7.65 g/l
Solution d'antibiotiques et de mycostatiques*	3 ml/l

Une fois le milieu préparé, ajouter stérilement 3 jaunes d'œufs frais.

***Préparation de la solution d'antibiotiques et de mycostatiques:**

Ajouter 1.000.000 UI de pénicilline cristallisée à un volume de 5 ml de sérum physiologique + 20 ml de Piramicine à 2.5 % (v/v) (pimafucine du commerce) + 5 ml d'une solution de chloramphénicol (0.5 g dissous dans l'éthanol à 95°).

3.7. Lait écrémé UHT commercial

La composition du lait écrémé UHT commercial utilisé est la suivante:

- ✓ Protéines: 30 g/l
- ✓ Glucide: 48 g/l
- ✓ Lipides: <1 g/l

La principale différence dans la composition d'un lait écrémé et d'un lait entier repose dans la concentration en lipide: elle est de 36 g/l pour le lait entier contre moins de 3 g/l pour le lait écrémé.

3.8. Saturation

Agents de saturation utilisés:

- ✓ BSA 99%, bovine sérum albumine, Sigma, A-3059 utilisée à 1% (p/v).
- ✓ HC, hydrolysate de caséine (cf. chapitre 3.4) utilisé à 20% (v/v).

Après sensibilisation de la plaque ELISA avec du LAM de *M.paratuberculosis* et le premier lavage (cf. protocole ELISA LAM 3.9) deux conditions ont été testées:

- ✓ Déposer 200 µl de solution de saturation BSA ou HC 3h à 37°C et une nuit à 4°C.
- ✓ Déposer 200 µl de solution de saturation BSA ou HC 1h à 37°C.

Effectuer un lavage comme décrit chapitre suivant et reprendre le protocole ELISA LAM au niveau du dépôt des échantillons.

3.9. ELISA LAM

Le protocole suivant est décrit pour la détection d'anticorps dirigés contre le LAM présent dans le sérum de bovins ou de souris.

Sensibilisation des plaques:

Diluer le LAM (1/5000) en tampon citrate.

Déposer 50 µl par puits, couvrir la plaque à l'aide d'un couvercle ou d'un adhésif et incubé une nuit à 4°C.

Lavage:

Laver 4 fois la plaque avec 300 µl/puits de PBS-Tween20.

Echantillons:**Sans absorption:**

Diluer les sérums de bovins au final à 1/100 dans du PBS-Tween80 + HC.

Diluer les sérums de souris au final à 1/50 dans du PBS-Tween80 + HC.

Absorption des sérums avec du LAM de *M.phlei*:

Les sérums de bovins à tester sont dilués au final à 1/100 en présence du LAM de *M.phlei* dilué au final à 1/200 dans du PBS-Tween80 + HC.

Les sérums de souris à tester sont dilués au final à 1/50 en présence du LAM de *M.phlei* dilué au final à 1/200 dans du PBS-Tween80 + HC.

Incuber 30 minutes sous agitation à température ambiante dans une microplaque de dilution par exemple. Couvrir la plaque (couverture, papier aluminium ou adhésif).

Incubation:

Déposer 50 µl de sérum absorbé ou non par puits de la plaque ELISA, incuber 1h à température ambiante. Couvrir la plaque.

Lavage:

Laver 4 fois la plaque avec 300 µl/puits de PBS-Tween20.

Conjugué:**Détection des anticorps de bovins:**

Diluer la protéine G marquée à la peroxydase 1/5000 en PBS-Tween80 + HC.

Déposer 50 µl par puits, incuber 1h à température ambiante. Couvrir la plaque.

Détection des anticorps de souris:

Diluer l'anticorps anti-souris marquée à la peroxydase 1/2000 en PBS-Tween80 + HC.

Déposer 50 µl par puits, incuber 1h à température ambiante. Couvrir la plaque.

Lavage:

Laver 4 fois la plaque avec 300 µl/puits de PBS-Tween20 0.1%.

Révélation:

Préparer la solution de révélation: 1 pastille OPD dans 25 ml de tampon phosphate citrate + 5 µl H₂O₂. Ajouter 100 µl de la solution de révélation par puits.

Incuber 20 minutes dans le noir. Couvrir la plaque.

Stopper la révélation avec 25 µl de H₂SO₄ 2 M par puits.

Lire en bichromatique à 492 nm et 620 nm.

Composition des tampons:

Tampon citrate: 50 mM citrate sodium, équilibré à pH 6 avec de l'acide citrique 35 mM.

PBS: Phosphate buffer saline: 0.012 M de Na₂HPO₄, 0.03 M de KH₂PO₄ et 0.145 M de NaCl.

PBS-Tween20: Phosphate buffer saline + Tween20 0.1% (v/v).

PBS-Tween80 + HC: Phosphate buffer saline + Tween80 0.1% (v/v) + HC 20% (v/v).

Tampon phosphate citrate: pH5 à 0.05 M, Sigma P 4809.

Matériels:

Plaques Greiner, Labortenik, n°655101.

GAM : anticorps anti-souris marqués à la peroxydase, DAKO, n°P0447.

Protéine G: Immunopure protein G, marquée à la peroxydase, 0.5 mg, Perbo Sciences, n°31499.

OPD : O-phenylenediamine dihydrochloride 10 mg par tablette Sigma, P-8287.

3.10. ELISA Pourquoiier

Contenu du KIT:

- ✓ Microplaques sensibilisées par des antigènes de *M.paratuberculosis*.
- ✓ Solution de lavage concentrée 20 fois.
- ✓ Tampon de dilution n° 12 pour les échantillons contenant des antigènes de *M.phlei*.
- ✓ Tampon de dilution n° 1 pour le conjugué.
- ✓ Sérums de contrôle positif et négatif lyophilisés.
- ✓ Conjugué monoclonal anti-IgG de ruminants marqué à la peroxydase.
- ✓ Solution de révélation 5 (TMB: tétra méthylbenzidine), solution d'arrêt H₂SO₄ 0.5 M.

Absorption des sérums à analyser par *Mycobacterium phlei*:

Reconstituer les sérums de contrôle avec 0.5 ml d'eau distillée.

Diluer les sérums (les échantillons de contrôle et ceux à tester) au 1/20 en tampon de dilution n° 12 en microtube ou tube à hémolyse.

Agiter puis incuber 1 heure à 21°C (ce temps d'incubation peut être prolongé jusqu'à deux heures).

Dépôt des sérums:

Déposer 200 µl d'échantillons de contrôle positif, négatif, et de chaque dilution de sérum à tester par puits. Homogénéiser le contenu des puits par une légère agitation de la plaque. Couvrir la plaque (couvercle, papier aluminium ou adhésif).

Incuber 1 heure à 21°C ou une nuit à 5°C.

Lavage:

Diluer un flacon "solution de lavage concentrée 20 fois" dans 1900 ml d'eau distillée. Cette solution est désignée par la suite solution de lavage. Cette dilution peut être réalisée avant la disparition des cristaux apparus à 5°C à condition d'utiliser la totalité des 100 ml du flacon.

Vider le contenu de la plaque par retournement ou préférentiellement par un dispositif automatique ou semi-automatique.

Remplir la totalité des puits de la plaque avec la solution de lavage puis les vider à nouveau.

Renouveler 2 fois l'opération (soit au total 3 lavages).

Dépôt du conjugué:

La dilution du conjugué est fonction du mode d'incubation utilisé pour les sérums.

- ✓ Incubation courte des sérums 1 heure à 21°C, diluer le conjugué au 1/100 en tampon de dilution 1 et déposer 100 µl par puits de conjugué dilué.
- ✓ Incubation longue des sérums une nuit à 5°C, diluer le conjugué au 1/200 en tampon de dilution 1 et déposer 100 µl par puits de conjugué diluer.

Couvrir la plaque et incuber 30 minutes à 21°C.

Lavage:

Vider le contenu de la plaque par retournement ou par un dispositif manuel ou automatique.

Remplir la totalité des puits de la plaque avec la solution de lavage puis les vider à nouveau.

Renouveler 2 fois l'opération (soit au total 3 lavages).

Révélation:

Déposer 100 µl de la solution de révélation 5 par puits. Incuber 20 minutes à 21°C à l'abri de la lumière. Déposer 100 µl de la solution d'arrêt par puits. Agiter légèrement jusqu'à homogénéisation de la solution colorée. Essuyer soigneusement le dessous de la plaque.

Lecture:

Lire les densités optiques à 450 nm.

3.11. ELISA IDEXX

Contenu du KIT:

- ✓ Microplaques sensibilisées avec des antigènes de *M.paratuberculosis*.
- ✓ Solution de lavage concentrée 10 fois.
- ✓ Contrôles positif et négatif.
- ✓ Solution contenant des antigènes de *M.phlei*.
- ✓ Conjugué HRPO-protéine G multi-espèce concentré 100 fois.
- ✓ Solution contenant le substrat TMB(tétra méthylbenzidine)/ H₂O₂, solution d'arrêt HCl 1M.

Préparation des réactifs:

Solution de lavages: mettre la solution de lavage concentré 10 fois à température ambiante et bien homogénéiser pour assurer la dissolution complète d'éventuels cristaux. La solution de lavage concentrée 10 fois est à diluer à 1/10 dans de l'eau MilliQ.

Conjugué HRPO: le conjugué concentré doit être dilué extemporanément au 1/100 dans la solution de lavage concentrée 1 fois.

Pré-incubation des échantillons:

Utiliser des tubes en plastic ou une microplaque vierge pour cette étape de pré-incubation.

- ✓ Distribuer 135 µl d'absorbant dans chaque puits ou chaque tube.
- ✓ Distribuer respectivement 15 µl de contrôle positif, négatif et d'échantillons à tester dans chaque puits ou tube. Bien homogénéiser le contenu.
- ✓ Incuber pendant 60 minutes à température ambiante (de 18 à 25°C).

Dépôts des échantillons:

Transférer 100 µl de chacun des contrôles et des échantillons pré-incubés dans les puits de la microplaque sensibilisée. Incuber 60 minutes à température ambiante (de 18 à 25°C) dans une chambre humide ou à défaut couvrir la plaque d'un film plastique adhésif pour prévenir l'évaporation.

Lavage:

Laver avec 300 µl par puits 5 fois avec la solution de lavage reconstituée. Vider les puits et tapoter énergiquement la plaque sur du papier absorbant afin d'éliminer le liquide résiduel.

Remarque: après incubation des échantillons, laver soigneusement la plaque afin d'éviter tout risque de contamination croisée. S'assurer de l'absence de trace de coloration.

Dépôt du conjugué:

Ajouter 100 µl de conjugué HPRO reconstitué dans chaque puits. Incuber 30 minutes à température ambiante (de 18 à 25°C) dans une chambre humide ou à défaut couvrir la plaque d'un film plastique adhésif pour prévenir l'évaporation.

Lavage:

Laver avec 300 µl par puits 5 fois avec la solution de lavage reconstituée. Vider les puits et tapoter énergiquement la plaque sur du papier absorbant afin d'éliminer le liquide résiduel.

Révélation:

Ajouter 100 µl de solution substrat TMB dans chaque puits. Incuber pendant 10 minutes à température ambiante (de 18 à 25°C) à l'obscurité. Décompter le temps d'incubation après le remplissage du premier puits. Stopper la réaction au bout de 10 minutes en ajoutant 100 µl de solution d'arrêt dans chaque puits. Distribuer la solution d'arrêt dans le même ordre que la solution substrat.

Lecture:

Lire les densités optiques à 450 nm en monochromatique ou en bichromatique à 450 nm et 620 nm.

3.12. Analyse statistique: test de McNemar et test du Kappa de Cohen

Les tests statistiques présentés dans ce chapitre vont servir à comparer les résultats des tests obtenus par l'ELISA LAM avec l'ELISA de la firme Pourquier et l'ELISA LAM avec l'ELISA de la firme IDEXX. N sérums sont évalués indépendamment par les trois tests. Les résultats sérologiques de deux techniques ELISA seront comparés, les échantillons testés forment ainsi une paire.

Les discordances et les concordances entre les deux résultats des tests présentent un intérêt pour la comparaison. La discordance est composée de l'ensemble des résultats différents entre les deux tests. La concordance est composée de l'ensemble des résultats identiques entre les deux tests.

Toutes les formules présentées dans ce chapitre sont directement adapter à notre cas. Ce tableau, appelé table de contingence, est la représentation de la situation que nous analyserons.

		Test 1		Total
		<i>positifs</i>	<i>négatifs</i>	
Test 2	<i>positifs</i>	A	B	n_{A+B}
	<i>négatifs</i>	C	D	n_{C+D}
Total		n_{A+C}	n_{B+D}	N

3.12.1. Analyse de la discordance : le test de McNemar.

Ce test porte sur les paires discordantes (C et B du tableau). Il est applicable si :

- ✓ La symétrie des paires discordantes est possible : quelle que soit la réponse au premier test, toutes les réponses sont possibles au second test.
- ✓ La somme des paires discordantes est au moins égale à 10.

La formule statistique est la suivante:

$$MN^{obs} = (C-B)^2 / (C+B)$$

Cette statistique a une distribution de probabilité de type χ^2 .

Le degré de liberté est défini comme le nombre de paire discordante. Dans notre cas le degré de liberté est 1, la paire discordante est formée par le couple CB.

Pour l'interprétation, on pose l'hypothèse nulle, H_0 , qui est l'hypothèse qui doit être testée avec un seuil de tolérance pour l'erreur fixé arbitrairement.

Cette hypothèse est généralement le contraire du but. Ici, nous poserons donc H_0 : les résultats des deux tests sont symétriques.

Le seuil de signification α (ou seuil de tolérance pour l'erreur) est la probabilité de rejeter H_0 dans le cas où H_0 est vraie, dans notre cas, $\alpha = 5\%$.

A un degré de liberté de 1 et à un seuil d'erreur de 5%, la table du Chi-Carré nous donne la valeur limite de 3.841.

- ✓ si $MN^{obs} < 3.841$: on ne rejette pas l'hypothèse d'une symétrie entre les résultats des deux tests, il n'y a pas une dissymétrie significative dans les discordance entre ces résultats.
- ✓ si $MN^{obs} > 3.841$: on rejette l'hypothèse d'une symétrie entre les résultats des deux tests.

Si le test de McNemar est significatif ($MN^{obs} > 3.841$), les discordances ne sont pas symétriques : les taux de réponses positives donnés par les deux techniques diffèrent significativement et donc, l'une va surpasser l'autre mais la plus faible peut être concordante avec la première. Si le test de McNemar est non significatif ($MN^{obs} < 3.841$), il y a symétrie dans les réponses: les taux de réponses positives donnés par les deux techniques sont comparables, mais elles peuvent être interchangeables ou bien se compléter selon qu'elles soient concordantes ou non. La concordance est analysée par le test du Kappa de Cohen (Agresti, 1996).

3.12.2. Analyse de la concordance : le test du Kappa de Cohen.

Ce test porte sur les paires concordantes (A et D du tableau). Il est applicable si $N \geq (2.r^2)$ où N est le nombre total d'échantillons testés et r le nombre de ligne.

La formule statistique est la suivante:

$$K_o = \frac{p_o - p_e}{1 - p_e}$$

p_o est la proportion d'accord observé: $p_o = \frac{(A + D)}{N}$

p_e est la proportion d'accord aléatoire: $p_e = \frac{(n_{A+B})(n_{A+C}) + (n_{C+D})(n_{B+D})}{N^2}$

On peut conclure directement à partir de K_o , le coefficient kappa observé.

K_o varie toujours entre -1 et $+1$.

- ✓ Si $K_o < 0$ alors il y a discordance.
- ✓ Si $0 < K_o < 0.4$ alors il n'y a que peu de concordance.
- ✓ Si $0.40 < K_o < 0.75$ alors il y a une bonne concordance.
- ✓ Si $K_o > 0.75$ alors il y a une excellente concordance.

La valeur du coefficient Kappa est indépendante de la taille de l'échantillon étudié. Alors pour évaluer le résultat de ce test et juger la probabilité d'erreur, on peut utiliser une approximation gaussienne, seulement si $N \geq (2.r^2)$ et $N \geq 25$.

La formule statistique est la suivante:

$$Z^{obs} = \frac{K_o \sqrt{N(1-p_e)}}{\sqrt{p_e}}$$

Cette statistique a une distribution de probabilité de type Normale: en fonction du Z^{obs} on peut utiliser la table correspondante, trouver la p -value et conclure (Agresti, 1996).

3.13. Fusion cellulaire

3.13.1. Immunisation des souris

➤ Protocoles d'immunisation

Trois protocoles différents d'immunisation des souris ont été utilisés.

Protocole A:

Les souris BALB/c ont été infectées avec des bactéries *M.paratuberculosis* vivantes. Un mg de bactéries (soit approximativement 10^7 CFU, colony forming unit) est injecté par souris par voie intraveineuse 3 fois à un intervalle de 2 mois.

Protocole B:

Les souris BALB/c ont été inoculées avec 0.1 mg de mycobactéries (soit approximativement 10^6 CFU) par voie sous cutanée. Les bactéries sont injectées en présence de 25 μ g d'adjuvant QuilA par souris. L'immunisation est effectuée toutes les trois semaines jusqu'à obtention d'un résultat positif.

Protocole C:

Les souris BALB/c ont été inoculées avec le culot bactérien obtenu lors de la préparation du LAM. 0.1 mg de protéines totales a été injecté par souris par voie intra péritonéale avec un adjuvant incomplet de Freund toutes les trois semaines jusqu'à obtention d'un résultat positif.

➤ Injection intra-splénique d'une souris, fait 3 ou 4 jours avant la fusion

Cette méthodologie est valable pour les deux méthodes de fusion utilisées.

Endormir la souris avec +/- 150 µl d'anesthésiant.

Lorsque le souris s'est endormi, la raser du coté gauche et désinfecter la peau avec de l'alcool.

Prendre une paire de petits ciseaux et une pince stérile avec des crochets et inciser la peau de la souris juste en bas des côtes.

Ensuite, inciser la membrane du péritoine qui est transparente.

Préparer l'antigène à injecter (20 µg dans un volume maximal de 100 µl de PBS stérile) dans une petite seringue.

Injecter tout doucement l'antigène dans la rate à plusieurs endroit de référence (on doit voir la rate blanchir).

Recoudre la membrane du péritoine avant la peau, faire deux points pour chaque suture.

Terminer en versant un peu de cicatrisant sur la plaie (Spitalen).

Remettre la souris dans une cage très propre, avec un peu d'eau mais attendre 24 heures pour lui donner à manger.

Anesthésiant:

- | | |
|--|--------|
| ✓ Soluté injectable de Kétamine 100mg/ml (Rhône Mérieux) | 2 VOL. |
| ✓ Rompun 2% (Bayer) | 1 VOL. |
| ✓ PBS stérile | 7 VOL. |

Faire le mélange au moment de l'emploi, injecter 120 à 150 µl du mixte par souris adulte.

3.13.2. Congélation et décongélation des cellules

➤ Congélation des myélomes et des hybridomes:

Préparation de la solution de congélation:

Solution de congélation: 20% (v/v) de DMSO dans du sérum de veau fœtal (SVF) à 80% (v/v).

Placer le SVF dans un tube et laisser au frais dans la glace. Ajouter lentement le volume approprié de DMSO et bien mélanger. Filtrer stérilement la solution en utilisant un filtre de 0.2 µm et garder dans de la glace.

Congélation:

Récolter les cellules et les resuspendre dans du SVF froid.

Ajouter volume à volume les cellules dans le tube contenant la solution de congélation. Continuer de mélanger pendant l'addition. Transférer les cellules dans un tube de congélation et placer à -80°C.

Remarque: la suspension finale est constituée de 90% de SVF et 10% de DMSO.

➤ **Décongélation et mise en culture des cellules (myélomes, hybridomes)**

Les cellules sont maintenues à -80°C tant qu'elles ne sont pas utilisées.

Décongeler les cellules rapidement en agitant le tube dans un bain-marie à 37°C .

Prélever les cellules et placer les dans un tube de 15 ml contenant 10 ml de milieu de culture et centrifuger à 400g pendant 10 minutes.

Remarque: cette étape est nécessaire pour enlever le DMSO.

Éliminer le surnageant et resuspendre les cellules dans 1 à 2 ml de milieu de culture.

Calculer le nombre de cellules en utilisant une cellule d'énumération (par exemple la cellule de Thoma).

Reprendre les cellules à raison de 7×10^3 cellules par ml dans du milieu de culture complet.

Placer les flacons dans une étuve à 37°C avec 5% de CO_2 et 95% d'humidité.

Laisser pousser les cellules à confluence et faire le passage des cellules tous les 2 à 4 jours.

Remarque: pour augmenter la viabilité des cellules lors de la décongélation, ne pas les laisser dans la solution de congélation plus de 15 minutes à température ambiante.

3.13.3. Obtention d'anticorps monoclonaux: ClonaCell™-HY: Hybridoma cloning kit

La figure 12 présente la procédure de cette fusion.

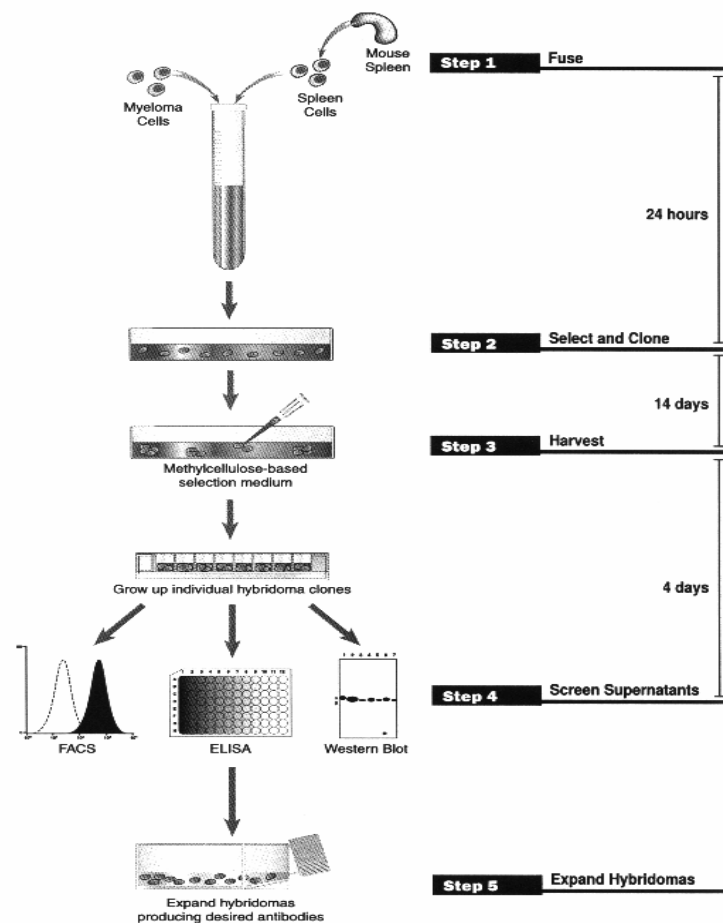


Figure 12: présentation de la procédure de la fusion avec le kit commercial ClonaCell.

➤ **Milieu de culture**

Milieu A: DMEM, gentamicine, sérum pré sélectionné.

Milieu B: DMEM, gentamicine.

Milieu C: DMEM, gentamicine, sérum pré sélectionné, suppléments.

Milieu D: DMEM, gentamicine sérum présélectionné, Methylcellulose, HAT, suppléments (milieu de sélection).

Milieu E: Polyethylene Glycol ClonaCell™-HY PEG Solution.

➤ **Les cellules de myélome**

Les cellules parentales des myélomes proviennent de souris BALB/c et ne doivent pas sécréter des anticorps. Nous utilisons des cellules SP2/0 qui fusionnent bien et permettent la formation d'hybridomes stables.

Décongeler les cellules et les mettre en culture dans le Milieu A de pré-fusion pendant minimum une semaine, afin de leur permettre de s'adapter correctement au milieu de culture. Vérifier que la densité cellulaire est de l'ordre de 5×10^4 cellules/ml et effectuer des passages environ tous les deux jours.

Calculer le taux de croissance à chaque passage. Le jour précédent la fusion, compter les cellules viables pour avoir minimum 2×10^7 cellules de myélome disponibles pour le jour suivant.

Récolter les cellules de myélomes dans un tube de 50 ml et centrifuger à 300g pendant 10 minutes. Laver 3 fois le culot avec 30 ml de Milieu B, milieu de fusion, et le resuspendre dans 21 ml de Milieu B. Compter les cellules vivantes, elles doivent avoir une viabilité supérieure à 95%. Calculer le volume de suspension cellulaire contenant 2×10^7 cellules pour l'étape de fusion.

➤ **Les splénocytes**

Sacrifier les souris immunisées et récolter leur sang pour des analyses sérologiques ultérieures. Après avoir stérilisé la surface avec de l'éthanol, et en utilisant des instruments stériles sous une hotte, ouvrir la cavité abdominale afin d'en extraire la rate.

Désagréger cette dernière dans du Milieu A et filtrer les cellules dans de la gaze stérile.

Laver les splénocytes 3 fois avec 30 ml de Milieu B et centrifuger à 400g pendant 10 minutes.

Récupérer le culot et resuspendre les cellules dans 25 ml de Milieu B.

Compter les cellules dans 3% d'acide acétique diluées au 1/10.

Calculer le volume de la suspension de cellule pour obtenir 1×10^8 cellules.

***Remarque importante concernant les myélomes et les splénocytes:** il est très important de retirer tout le sérum adhérent aux cellules en les lavant avec du milieu B exempt de sérum, car autrement le PEG ne peut pas agir correctement et l'efficacité de la fusion va chuter de façon importante.*

➤ **La fusion**

Ajouter 1×10^8 splénocytes viables aux 2×10^7 cellules de myélome dans un volume de 50 ml et centrifuger 10 minutes à 400g. Enlever le surnageant.

***Remarque:** l'élimination complète du surnageant est essentielle pour éviter une dilution du PEG dans la prochaine étape.*

Ajouter lentement 1 ml de PEG sur le culot précédemment obtenu en utilisant une pipette de 1 ml et ce sur une période d'une minute. Agiter doucement et continuellement les cellules avec la pointe de la pipette pendant une autre minute.

Ajouter 4 ml de Milieu B au mélange obtenu, en agitant comme précédemment sur une période de 4 minutes.

Ajouter doucement 10 ml de Milieu B. Incuber pendant 15 minutes dans un bain-marie à 37°C.

Ajouter doucement 30 ml de Milieu A. Centrifuger les cellules à 400g pendant 7 minutes. Enlever le surnageant et laver le culot dans 40 ml de Milieu A en s'assurant que tout le PEG a été enlevé. Resuspendre doucement le culot dans 10 ml de Milieu C. Transférer la suspension dans un flacon de culture cellulaire de 250 ml contenant 40 ml de Milieu C (volume total de la culture de 50 ml). Incuber pendant 16 à 24 heures à 37°C.

➤ Clonage et sélection

Décongeler le milieu de sélection (Milieu D) dans le réfrigérateur un jour avant la fusion. Le jour de la fusion, mélanger vigoureusement le flacon et laissez-le réchauffer à température ambiante.

Transférer les cellules dans un tube de 50ml et centrifuger pendant 10 minutes à 400g. Resuspendre les cellules dans un volume de 10 ml de Milieu C.

Remarque: il est critique de ne pas augmenter le volume final de plus de 10 ml, si l'on ne veut pas diluer le milieu de sélection, milieu D.

Transférer les 10 ml de la suspension cellulaire dans le Médium D. Agiter doucement en inversant le flacon et laisser reposer 15 minutes à 37°C pour permettre aux bulles de remonter à la surface du milieu. En utilisant une seringue de 12cc avec une aiguille fine droite, distribuer 9.5 ml de la suspension cellulaire en milieu D dans une boîte de Pétri de 100 mm. Faire bien attention à bien répartir le milieu et à ne pas introduire de bulles.

Incuber les boîtes à 37°C dans une atmosphère de 5% en CO₂ et 95% d'humidité. Ne pas remuer les boîtes pendant 10 à 14 jours.

Remarque: l'incubateur doit être bien humidifié et il est recommandé de mettre les boîtes dans un conteneur en plastique avec des boîtes de Pétri contenant 10 ml d'eau distillée stérile.

➤ Récolte

10 à 14 jours plus tard, examiner les boîtes de Pétri et observer les colonies au microscope. Prélever stérilement chaque colonie isolée et la transférer dans un puits d'une plaque de 96 puits contenant 200 µl de milieu de croissance (Milieu E).

Remarque: prendre des colonies de différentes tailles. En effet les clones à croissance lente (i.e. les petites colonies) sont souvent de très bons producteurs d'anticorps. Ces clones ne sont généralement pas sélectionnés par d'autres procédures de criblage utilisant des milieux liquides, car ils ne peuvent rivaliser avec les clones à croissance rapide.

Incuber les plaques à 37°C dans une atmosphère à 5% du CO₂ pendant 1 à 4 jours sans remettre de milieu. Habituellement au quatrième jour, la densité cellulaire est élevée et le pH du milieu s'acidifie, ce dernier passe du rouge au jaune (grâce à un indicateur colore de pH).

Pour détecter les hybridomes sécrétants, prélever un peu de surnageant et tester la présence d'anticorps par une méthode adéquate (étape de criblage).

Renouveler le milieu des hybridomes avec 150 µl de milieu frais Milieu E pour chaque puits de la plaque.

Resuspendre doucement les hybridomes montrant une réponse positive à l'analyse. Transférer 100 µl de chaque hybridome positif dans 1 puits d'une plaque de 24 puits, contenant 1 ml de Milieu E.

Lorsque les cellules ont atteint une densité appropriée, congeler une partie des cellules provenant d'un puits.

les cellules qui restent sont ensuite multipliées dans un mélange 50/50 de Milieu A et de Milieu E.

Lorsque les cellules ont atteint une densité appropriée, les multiplier dans 100% de Milieu A, et les maintenir dans ce milieu.

3.13.4. Préparation d'anticorps monoclonaux: méthode classique

Protocole de Galfré et al, 1977.

Cette méthode a été historiquement la première à être développée comme méthode de production d'anticorps monoclonaux (Kolher et Milstein, 1975).

➤ Milieu de culture

RPMI 1640(1X) BioWhittaker: avec 20 mM Hepes (sans bicarbonate de sodium et sans glutamine). Cat. n°12-167F.

HT (hypoxantine thymidine): supplément 50X Gibco Cat. n°41065-012.

Aminoptérine: 100X Gibco Cat. n°11362-019.

Pyruvate de sodium: 100 mM Gibco Cat. n°11360-039.

Acides aminés non essentiels: (100X) Gibco Cat. n°11140-035.

L-glutamine: 200 mM (100X) Gibco Cat. n°25030-024.

Sérum de veau fœtal (SVF): (utiliser à raison de 15%). Tous les sérums de veau ne conviennent pas pour les monoclonaux. Il est donc très important de les sélectionner et d'utiliser des sérums prévus pour la fusion.

Anti-PPLO: (100X): Gibco Cat. n°15220-049.

Gentamicine: 10 mg/ml Gibco Cat. n°15710-049.

MILIEU PREPARES

RPMI complet: RPMI, avec 1 % (v/v) d'anti-PPLO, 50 µg/ml de gentamicine, 2 mM de glutamine, 1 mM de pyruvate de sodium, 1 % (v/v) du mélange d'acides aminés non essentiels et 15 % de SVF.

Milieu RPMI complet + HT: RPMI 1640 complet + HT supplément 2% (v/v).

Milieu RPMI complet + HAT: HT complet + aminoptérine 1% (v/v).

PEG: P.Mol.1300-1600 HYBRI-MAX Sigma.

➤ Jour –6: préparation des cellule de myélomes

Décongeler un tube de Myélome SP₂-P4₃ le plus rapidement possible à 37°C.

Transvaser le contenu stérilement dans un tube Falcon conique de 15ml et rajouter un peu de milieu RPMI.

Centrifuger à 1200 tours pendant 10 minutes

Éliminer le surnageant et resuspendre les cellules dans environ 30 ml de RPMI complet.

Incuber à 37°C sous une atmosphère de 5% de CO₂.

Jusqu'au jour de la fusion, passer les cellules de façon à ce qu'elles soient en croissance exponentielle.

On compte en général une génération toutes les 12 heures.

➤ Jour –3: test de sensibilisation au HAT complet

Multiplier une petite partie des cellules du myélome dans du milieu complet + HAT pendant 2 à 3 jours. Après ce test de sensibilisation au HAT, toutes les cellules du myélome doivent être mortes car elles sont normalement incapables de survivre dans ce milieu.

C'est à cette période qu'il faut effectuer l'injection intra-splénique à la souris (cf. chapitre 3.13.1).

➤ **Jour-1: préparation de macrophages**

Ils sont préparés à partir des macrophages péritonéaux de souris BALB/c, le jour précédant la fusion. Les souris sont tuées soit par le chloroforme soit en leur brisant la nuque. Les souris sont ensuite mises sous la hotte et désinfectées à l'alcool.

Injecter par voie intrapéritonéale 5 ml d'une solution stérile de saccharose 0.34 M (injecter au niveau de l'ombilic et bien masser le ventre pour répartir la solution).

Récupérer le liquide injecté par une ponction stérile dans un tube falcon cône de 15 ml. Si plusieurs souris doivent être ponctionnées, mettre les tubes dans la glace.

Vérifier l'absence de bactéries dans les différents prélèvements (observation au microscope optique). En cas de contamination, jeter ce tube et refaire un prélèvement.

Centrifuger les macrophages à 800g pendant 5 minutes. Eliminer le surnageant et remettre le culot en suspension à la concentration approximative de 5×10^4 cellules/ml dans du milieu RPMI complet + HAT.

Distribuer 100 µl par puits de la solution de macrophage et préparer 12 boîtes de 96 puits à fond plats stériles, placer les boîtes à l'étuve à 37°C.

Prévoir au moins 3 boîtes de culture de SP₂-P₄₃ (175 cm²) pas trop confluentes pour que les cellules soient en pleine croissance.

➤ **Jour 0: FUSION**

S'assurer que les macrophages ne sont pas infectés et que les myélomes sont en pleine croissance.

Prélèvement de la rate:

La souris est tuée en lui coupant la gorge à l'aide d'une lame afin de récupérer le sang. Mettre la souris sous la hotte et la désinfecter à l'alcool.

Remarque: lorsque le sang est coagulé, centrifuger à 700g pendant 10 minutes. Récupérer le sérum et le garder à - 20°C pour l'inclure par la suite dans les tests.

Couper la peau stérilement près de la première cicatrice et prélever la rate et la mettre dans une petite boîte de Pétri stérile. Laver la rate dans du milieu RPMI et enlever la graisse qui pourrait éventuellement se trouver autour de la rate.

Transvaser alors la rate dans une autre petite boîte de Pétri et y ajouter 5 ml de RMPI.

Avec une seringue de 5 ml et une aiguille de 22 G perfuser alors la rate. Recommencer 6 à 7 fois jusqu'au moment où tous les lymphocytes sont sortis dans le milieu.

Prélever alors ce qui reste de la rate et le découper en tous petits morceaux.

Transvaser le tout dans un tube Falcon de 15 ml et bien rincer la boîte avec +/- 3 ml de milieu RPMI.

Laisser décanter les gros morceaux ou filtrer sur de la gaze stérile et transvaser le surnageant ou le filtrat dans un tube cône de 15 ml.

Centrifuger à 500g pendant 5 minutes en gardant une température de 20°C. Eliminer le surnageant et laver le culot avec 10 ml de milieu RPMI en mélangeant doucement le culot.

Répéter la centrifugation et le lavage trois fois.

Resuspendre alors le culot cellulaire dans 10 ml de milieu RPMI.

Compter les lymphocytes:

Diluer les cellules au 1/10 et ajouter un peu de bleu trypan aux cellules pour pouvoir calculer la viabilité des cellules.

Mettre une goutte sur une cellule de Thoma (ne pas compter les globules rouges ni les cellules colorées en bleu). Une rate donne en moyenne 10^8 cellules.

Les myélomes:

Prélever les cellules dans les boîtes de culture en les décrochant avec une pipette de 10 ml. Centrifuger à 250g pendant 10 minutes. Eliminer le surnageant et reprendre les cellules dans 10 ml de milieu. Faire une dilution au 1/10 comme pour les lymphocytes et compter les cellules.

La fusion:

On mélange les lymphocytes et les myélomes dans un rapport de 5/1 ($10^8 + 2 \cdot 10^7$).

Prélever alors la quantité nécessaire de myélomes et de lymphocytes puis les mélanger ensemble dans un tube Falcon conique de 50 ml. Centrifuger le tout à 700g pendant 5 minutes. Eliminer complètement le surnageant. Maintenir le tube avec le culot de cellules dans l'eau à 37°C et prendre 1 ml de PEG à 50% à 37°C. L'ajouter en tournant délicatement dans le culot pendant environ 1 minute, ajouter 3 fois de suite 1 ml de RPMI (sans SFV) toujours en tournant pendant 1 minute.

La quatrième fois ajouter 7 ml de milieu. Retirer le tube de l'eau et centrifuger à 230g pendant 5 minutes.

Eliminer le surnageant et reprendre le culot dans 45 ml de RPMI complet.

Resuspendre les cellules de façon à ce qu'elles forment encore des amas et placer le tube pendant 2 heures à l'étuve à 37°C.

Centrifuger les cellules à 230g pendant 5 minutes et éliminer le surnageant.

Reprendre le culot dans 60 ml de RPMI complet +HAT à 37°C. Prendre les 12 boîtes de 96 puits avec les macrophages de la veille et y ajouter 50 µl/puits.

Remettre les boîtes à l'étuve et surtout ne pas y toucher pendant 2 jours.

➤ Jour 4:

Bien observer les 12 boîtes afin de vérifier l'absence d'infection. On remarque qu'il y a beaucoup de cellules mortes et de déchets. Ce sont les cellules non fusionnées. On commence à observer des grosses cellules bien réfringentes (cellules fusionnées).

➤ Jour 6

Renouveler le milieu ; incliner légèrement la boîte et aspirer tout doucement le surnageant (100 µl/puits). Changer de pointe stérile pour chaque puits. Remettre ensuite 100 µl/puits de RPMI complet + HT et remettre les boîtes à l'étuve à 37°C.

➤ Jour 10

Commencer à repérer les hybridomes dans les puits en les entourant de marqueur. Les observer tous les jours qui suivent et remettre encore ± 75 µl/puits de RPMI complet + HT.

Attendre au moins 3 jours avant de prélever les surnageants et de faire la détection ELISA. Ne pas oublier d'inclure le sérum de la souris tuée dilué à 1/50 et un témoin négatif.

Quand les hybridomes envahissent la cupule à \pm trois quarts, prendre du surnageant délicatement sans les cellules. A chaque prélèvement remettre le même volume de RPMI complet + HT frais.

La veille de la détection, il ne faut pas oublier de prendre une souris pour refaire des nouveaux macrophages et les reprendre cette fois dans de RPMI complet + HT.

Les distribuer dans des boîtes stériles de 24 puits (diamètre 1.6 cm) à un volume de 1 ml/puits et dans des boîtes de culture 25 cm² pour pouvoir multiplier les cellules en vue de la congélation. Placer ces boîtes à l'étuve à 37°C.

Repérer les clones producteurs qui deviennent trop confluent, et les transférer dans les boîtes de 24 puits avec les macrophages.

Attendre 2 à 3 jours pour que ces clones se soient suffisamment développés et passer à l'étape de clonage par dilution limite.

➤ **Clonage par dilution limite**

Le clonage par dilution limite consiste à diluer les cellules pour obtenir une cellule par puits, ceci représente une cellule pour 200 µl de milieu soit 5 cellules/ml.

Trois dilutions seront effectuées afin d'être certain d'avoir les meilleures conditions.

Les dilutions à effectuer à partir des cellules donnant un résultat positif en ELISA LAM sont:

- ✓ 25 cellules/ml
- ✓ 5 cellules/ml
- ✓ 1 cellule/ml

Après dilutions, les cellules sont distribuées dans des plaques de culture de 96 puits, à raison de 200 µl/puits et 24 puits par dilution.

Seuls les puits ne contenant qu'une cellule sont sélectionnés et lorsque les cellules se sont suffisamment développées, le surnageant présent dans les puits est testé avec l'ELISA LAM.

4. Résultats

Dans un premier temps, et avant même de commencer la mise au point de cet ELISA LAM sur les colostrums, il faut tout d'abord préparer le matériel nécessaire à sa réalisation: la purification de l'antigène LAM de *M.paratuberculosis* et la purification du LAM de *M.phlei* servant lors de l'étape d'absorption. Une fois le matériel obtenu, il faudra déterminer les dilutions adéquates de ces deux composants afin qu'ils puissent être utilisés.

Dans un deuxième temps, nous allons commencer la mise au point de l'ELISA LAM sur les colostrums, ce qui va nécessiter le test de différents paramètres.

Dans un troisième temps, nous allons tester une série d'échantillons de colostrum ainsi que les sérums correspondants des même animaux. Ces tests permettront d'observer une éventuelle corrélation entre les résultats obtenus en ELISA LAM des deux types d'échantillons et de définir un cut-off de l'ELISA LAM sur le colostrum.

Dans un quatrième temps, afin d'évaluer l'ELISA LAM sérum vis à vis de deux autres ELISA commerciaux, nous testerons des sérums provenant de fermes ayant des statuts définis. Nous discuterons des résultats obtenus.

Enfin, nous discuterons les résultats obtenus avec les fusions cellulaires pour l'obtention d'anticorps spécifiques du LAM de *M.paratuberculosis*.

4.1. Principe de l'ELISA LAM absorbé

L'ELISA LAM est un ELISA indirect avec une étape d'absorption. Cet ELISA a été mis au point dans le laboratoire pour le diagnostic sérologique de *M.paratuberculosis* (cf. matériels et méthodes). Le principe de cet ELISA LAM indirect est illustré figure 13.

C'est à partir du protocole établi pour l'ELISA LAM sur les sérums que nous commencerons la mise au point de l'ELISA LAM sur les colostrums.

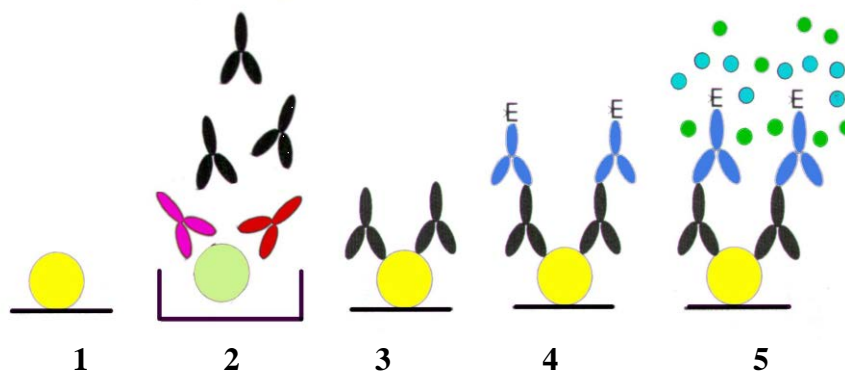


Figure 13: principe de l'ELISA LAM indirect avec une étape d'absorption.

- ✓ **Etape 1:** sensibilisation de la plaque ELISA par l'antigène constitué par le LAM de *M.paratuberculosis* (jaune).
- ✓ **Etape 2:** absorption des anticorps non spécifiques (rose et rouge) par le LAM de *M.phlei* (vert) dans une microplaque de dilution.
- ✓ **Etape 3:** mise en présence du sérum absorbé par le LAM de *M.phlei* sur la plaque sensibilisée par l'antigène.
- ✓ **Etape 4:** reconnaissance des anticorps primaires (noir) par les anticorps secondaires couplés à la peroxydase (bleu).
- ✓ **Etape 5:** ajout du substrat: l'H₂O₂ et le chromogène.

Les lavages s'effectuent sur la plaque ELISA après l'étape 1, 3 et 4.

La sensibilisation de la plaque s'effectue avec le LAM de *M.paratuberculosis* qui constitue l'antigène.

L'une des particularités de ce test est l'étape d'absorption des échantillons réalisée avec le LAM de *M.phlei*. En effet, les animaux peuvent être sensibilisés par des mycobactéries environnementales, créant ainsi de faux positifs lors des tests sérologiques. Cette étape permet donc d'augmenter la spécificité du test en éliminant la fixation des anticorps non spécifiques sur le LAM de *M.paratuberculosis* (Nielsen *et al.*, 1992). Les anticorps qui forment un complexe avec le LAM de *M.phlei* ne pourront plus interagir avec le LAM de *M.paratuberculosis*. Les échantillons ainsi absorbés seront déposés sur la plaque sensibilisée; seuls les anticorps libres dans l'échantillon réagiront avec ce dernier (ils constituent les anticorps primaires).

Le conjugué utilisé est la protéine G couplée à une enzyme, la peroxydase qui possède un substrat: l'H₂O₂ et le chromogène. La réduction du peroxyde par l'enzyme conduit à la libération d'un hydrogène. Cet hydrogène servira à l'oxydation du chromogène qui est l'OPD pour l'ELISA LAM (mais d'autres chromogènes peuvent être utilisés comme le TMB...). La coloration ainsi obtenue pourra être mesurée par un spectrophotomètre (Crowther, 1995).

Les lavages sont très importants à toutes les étapes, ils permettent d'enlever les réactifs en excès (le LAM de *M.paratuberculosis*, les anticorps primaires, les conjugués). Ces derniers pourraient par la suite interférer avec la réaction provoquant ainsi un bruit de fond important.

Remarque: la protéine G, qui est une protéine produite par les streptocoques qui a la propriété de se fixer spécifiquement sur la partie Fc des immunoglobulines, IgG1, IgG2 et IgG3 des bovins. Ce n'est pas un anticorps (Goddeeris, 1998).

4.2. Préparation du matériel de l'ELISA LAM

Cet ELISA LAM, mis au point par le laboratoire, nécessite une étape de préparation du matériel constitué par le LAM de *M.paratuberculosis* et le LAM de *M.phlei*. Ces derniers ne sont pas disponibles dans le commerce.

- ✓ Le LAM de *M.paratuberculosis* sert d'antigène.
- ✓ Le LAM de *M.phlei* sert pour l'étape d'absorption des échantillons.

Nous avons donc préparé du LAM à partir de ces deux mycobactéries pour pouvoir effectuer tous les tests présentés par la suite.

4.2.1. Purification et caractérisation du LAM

Le protocole utilisé afin de purifier le LAM à partir de mycobactéries entières repose sur le protocole établi par Jark (Jark *et al.*, 1997). Cette méthode utilise plusieurs outils tel que la presse de French, la centrifugation, la digestion à la protéinase K, la filtration, l'ultrafiltration, dans le but de purifier le LAM en éliminant les débris cellulaires et les protéines. Les différentes étapes de purification du LAM sont résumées figure 14.

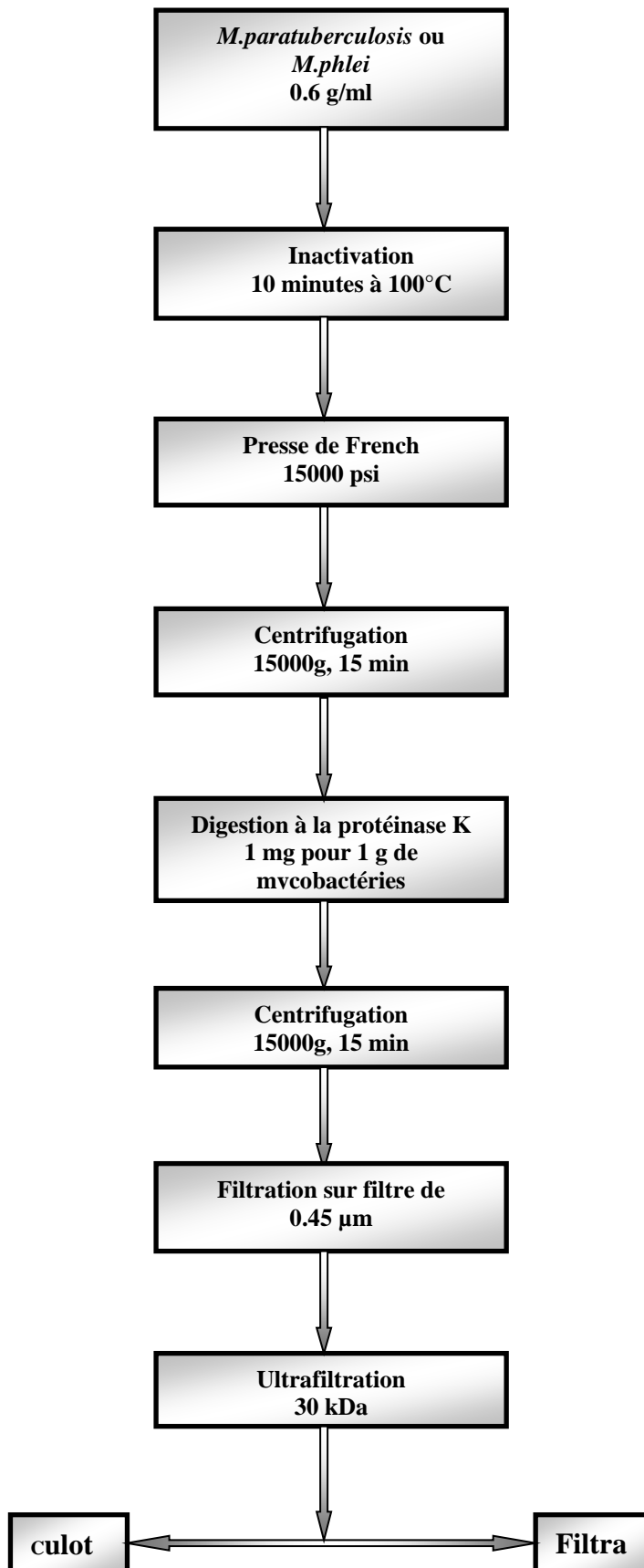


Figure 14: présentation des différentes étapes de purification du LAM à partir de mycobactéries entières (Jark *et al.*, 1997).

Afin de vérifier le bon déroulement de la purification, nous avons prélevé des échantillons à certaines étapes (figure 15 A, page suivante):

- ✓ Un échantillon correspondant au culot obtenu après la centrifugation qui suit la presse de French.
- ✓ Un échantillon correspondant au filtrat 0.45 µm obtenu après la filtration sur filtre de 0.45 µm.
- ✓ Un échantillon correspondant au filtrat du centricon.
- ✓ Un échantillon correspondant au LAM purifié.

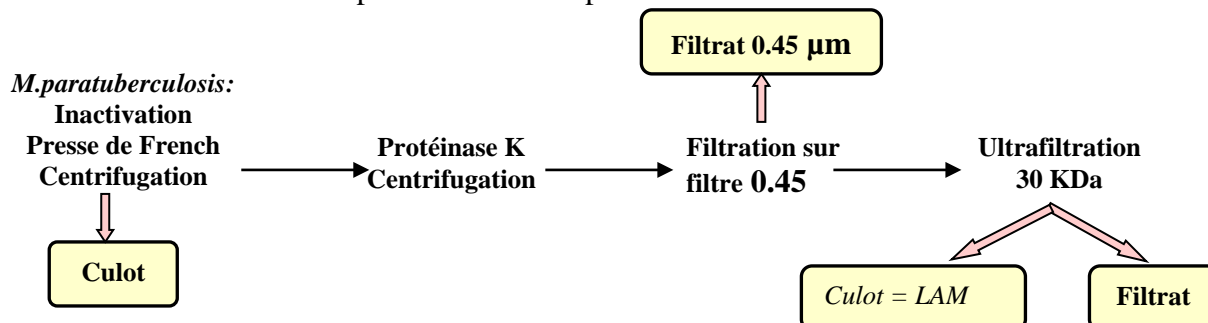


Figure 15 A: résumé du protocole de purification du LAM montrant les étapes après lesquelles nous avons prélevé les échantillons utilisés pour le gel au bleu de coomassie et le western blot.

Pour contrôler ces échantillons, nous avons réalisé deux migrations en conditions dénaturantes: l'une a servi pour une coloration du gel au bleu de coomassie et l'autre pour un western blot révélé avec le sérum positif (++) provenant d'un animal infecté naturellement par *M. paratuberculosis* (cf. matériels et méthodes).

Pour avoir des éléments de référence, nous avons testé en parallèle une préparation du LAM de *M. paratuberculosis* purifiée lors d'une précédente extraction.

Les résultats présentés ici concernent l'extraction du LAM de *M. paratuberculosis*, mais la méthode est la même pour l'extraction du LAM de *M. phlei* (dans ce cas, le western blot devra s'effectuer avec un sérum contenant des anticorps dirigés contre *M. phlei*).

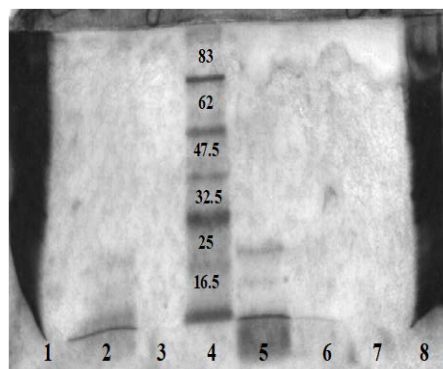


Figure 15 B: coloration du gel SDS PAGE au bleu de coomassie.

- ✓ **Piste 1:** culot de l'ancien lot.
- ✓ **Piste 2:** LAM de l'ancien lot.
- ✓ **Piste 3:** filtrat de l'ancien lot.
- ✓ **Piste 4:** marqueurs de poids moléculaire en kDa.
- ✓ **Piste 5:** LAM du nouveau lot.
- ✓ **Piste 6:** Filtrat 0.45 µm du nouveau lot.
- ✓ **Piste 7:** filtrat du nouveau lot.
- ✓ **Piste 8:** culot du nouveau lot

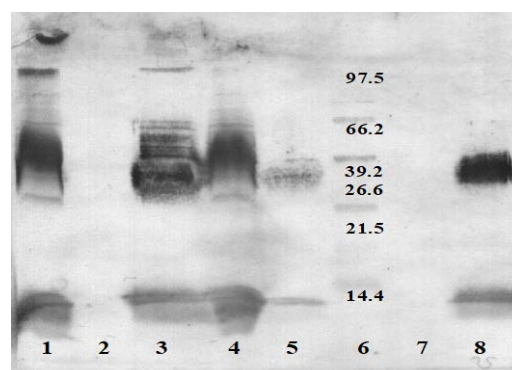


Figure 15 C: western blot en gel SDS-PAGE.

- ✓ **Piste 1:** culot de l'ancien lot.
- ✓ **Piste 2:** filtrat de l'ancien lot.
- ✓ **Piste 3:** LAM de l'ancien lot.
- ✓ **Piste 4:** culot du nouveau lot.
- ✓ **Piste 5:** Filtrat 0.45 µm du nouveau lot.
- ✓ **Piste 6:** marqueurs de poids moléculaire en kDa.
- ✓ **Piste 7:** filtrat du nouveau lot.
- ✓ **Piste 8:** LAM du nouveau lot.

Analyse du culot:

Les mycobactéries inactivées vont être tout d'abord fragmentées par la presse de French. La centrifugation qui suit va nous permettre d'éliminer tous les éléments insolubles qui se retrouvent alors dans le culot. Lorsque ce culot est testé par les deux techniques citées précédemment, nous obtenons les résultats suivants:

- ✓ **Coloration au bleu de coomassie:** les pistes 1 et 8 de la figure 5 B présentent une grande quantité de protéines de divers poids moléculaires.
- ✓ **Le western blot:** les pistes 1 et 4 de la figure 5 C révèlent une bande diffuse à environ 40 kDa correspondant au poids moléculaire apparent du LAM.

Le test des culots par ces deux méthodes nous permet de constater, que dès cette première étape nous éliminons une grande quantité de contaminants protéiques qui restent dans le culot, mais aussi que nous perdons du LAM.

Analyse du filtrat 45 µm:

Le surnageant récupéré va subir une digestion à la protéinase K, une sérine protéase ayant une très large gamme de substrats protéiques. Cette étape permet de dégrader les protéines encore présentes. Une filtration sur filtre de 45 µm permet d'enlever les débris supérieurs à cette taille.

Un échantillon prélevé après cette étape a été analysé:

- ✓ **Coloration au bleu de coomassie:** dans la piste 6 de la figure 5 B, aucune protéine n'est détectée.
- ✓ **Le western blot:** la piste 5 de la figure 5 C montre une bande de faible intensité d'une taille de 36.3 kDa correspondant au poids moléculaire apparent du LAM.

Le LAM est partiellement purifié et la majeure partie des protéines a été éliminée. Il est à noter qu'à cette étape, la préparation obtenue est encore très diluée.

Analyse du Filtrat et du LAM purifié:

La préparation recueillie va être soumise à une ultrafiltration avec un cut-off de 30 kDa. Ceci permet l'élimination de tous les contaminants ayant un poids moléculaire inférieur à 30 kDa et une concentration du LAM purifié.

L'analyse du filtrat donne les résultats suivants:

- ✓ **Coloration au bleu de coomassie:** dans les pistes 3 et 7 de la figure 5 B, aucune protéine n'est détectée.
- ✓ **Le western blot:** les pistes 2 et 7 de la figure 5 C montrent l'absence d'une bande correspondant au LAM.

Ces résultats montrent que nous n'avons ni protéines ni LAM dans le filtrat obtenu. Ceci correspond au résultat attendu puisque le LAM a un poids moléculaire apparent supérieur à 30 kDa, il reste alors dans le centricon.

L'analyse du LAM purifié donne les résultats suivants :

- ✓ **Coloration au bleu de coomassie:** les pistes 2 et 5 de la figure 5 B présentent deux bandes à environ 26.3 kDa et 21 kDa.
- ✓ **Le western blot:** les pistes 3 et 8 de la figure 5 C présentent une bande plus ou moins diffuse d'une taille de 36.3 kDa.

Les deux bandes observées en gel coloré au bleu de coomassie, ne sont pas révélées en western blot indiquant que ce ne sont pas des protéines reconnues par les anticorps du sérum positif (++). Il faut noter que ces bandes n'apparaissent pas dans l'étape précédente (correspondant à l'échantillon du filtrat 0.45 µm, piste 6). Ceci est probablement dû à ce que l'échantillon est encore très dilué mais il est concentré dans la préparation finale du LAM. La protéinase K qui a un poids moléculaire de 28.8 kDa pourrait être une à l'origine de ces bandes. Le résultat du western blot présente le résultat attendu, c'est à dire une bande à 36.3 kDa correspondant au LAM.

Les deux lots de préparation du LAM de *M.paratuberculosis* (l'ancien et le nouveau lot) présentent un profil similaire en gel coloré au bleu de coomassie ainsi qu'en western blot. Ceci reflète la

reproductibilité de la méthode d'extraction utilisée. Nous avons donc purifié du LAM de *M.paratuberculosis* ainsi que du LAM de *M.phlei*. Il faut maintenant déterminer la concentration adéquate pour les utiliser dans le test ELISA LAM.

4.2.2. Détermination des dilutions des LAM de *M.paratuberculosis* et de *M.phlei*

Contrairement aux protéines, qui peuvent facilement être dosées par diverses méthodes, le LAM constitué essentiellement de sucre, ne peut être directement dosé par une méthode simple.

Nous avons opté pour une solution d'optimisation fonctionnelle consistant à tester par des dilutions en séries chaque nouveau lot du LAM de *M.paratuberculosis* et du LAM de *M.phlei* afin de déterminer la dilution qu'il conviendra d'utiliser pour L'ELISA LAM.

Le principe de la détermination des dilutions des LAM de *M.paratuberculosis* et de *M.phlei* est le suivant: nous utilisons différentes dilutions du LAM (de *M.paratuberculosis* ou de *M.phlei*), et sur chaque dilution du LAM nous testons des sérums connus (sérum positif, sérum négatif et/ou sérum *M.phlei*) eux-mêmes dilués en série.

➤ Détermination de la dilution du LAM de *M.paratuberculosis* à utiliser

Réalisation du test:

Pour déterminer la dilution adéquate de l'antigène (le LAM de *M.paratuberculosis*) nous allons effectuer des dilutions de 2 paramètres: le LAM de *M.paratuberculosis* à tester et les sérums de contrôle (le sérum positif (++) et le sérum négatif).

Nous réalisons l'ELISA dans les conditions suivantes:

- ✓ La sensibilisation de la plaque ELISA est effectuée par le LAM de *M.paratuberculosis* dilué à: 1/2500, 1/5000, 1/10000, 1/20000 et 1/40000.
- ✓ Le test de deux sérums de contrôle: le sérum positif (++) et le sérum négatif, dilués en série de 1/5 en 1/5 sur 8 dilutions. Les dilutions finales sont les suivantes: 1/5, 1/25, 1/125, 1/625, 1/3125, 1/15625, 1/78125 et 1/390625.
- ✓ Il n'y a pas d'étape d'absorption avec le LAM de *M.phlei*.

L'objectif est d'obtenir une dilution du LAM de *M.paratuberculosis* tel que l'on ait un signal maximal avec le sérum de contrôle positif (++) pour un bruit de fond minimal avec le sérum de contrôle négatif.

Résultats:

Les résultats de cet ELISA LAM sont présentés figure 16. L'interprétation des courbes obtenues est basée sur deux points:

- ✓ L'allure générale des courbes indiquant l'évolution du signal.
- ✓ La dilution à 1/100 correspondant à 2 sur l'axe des abscisses qui est la dilution à laquelle sont testés habituellement les échantillons de sérum.

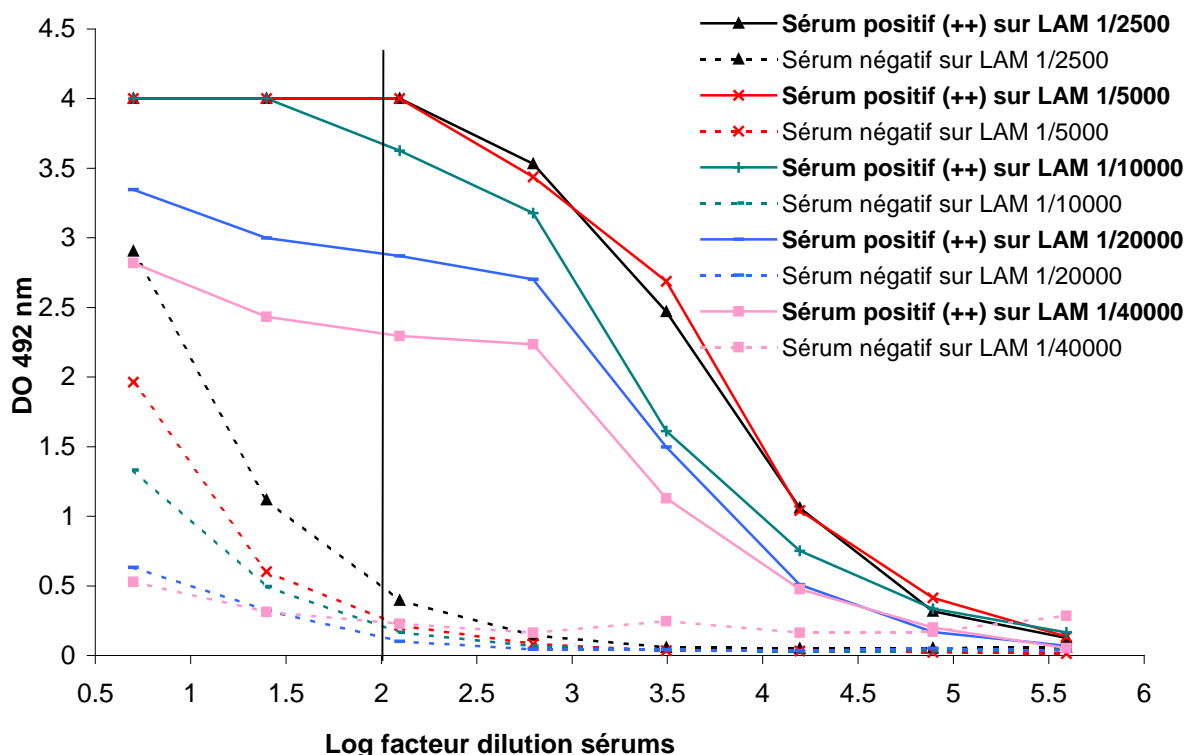


Figure 16: détermination de la dilution du LAM de *M.paratuberculosis*.

En regardant la dilution 1/100 des sérums positifs, nous pouvons choisir deux dilutions du LAM: 1/2500 et 1/5000, avec lesquelles nous obtenons un signal optimal.

Lorsque nous regardons les sérums négatifs correspondant à ces dilutions, notre choix s'arrête sur la dilution 1/5000 car le signal obtenu est maximal avec le sérum positif et faible avec le sérum négatif.

Les autres dilutions du LAM de *M.paratuberculosis* ne conviennent pas, les signaux obtenus avec le sérum positif (++) sont trop faibles.

➤ Détermination de la dilution du LAM *M.phlei* à utiliser pour l'étape d'absorption

Réalisation du test:

Cette étape d'absorption par le LAM de *M.phlei* est très importante pour éliminer les anticorps non spécifiques pouvant se lier sur le LAM de *M.paratuberculosis*.

Dans le but de déterminer la dilution adéquate du LAM de *M.phlei* à utiliser pour l'étape d'absorption nous allons effectuer des dilutions en série de 2 paramètres: le LAM de *M.phlei* à tester et les sérums de contrôle (le sérum positif (++) et le sérum *M.phlei*).

Nous réalisons l'ELISA LAM dans les conditions suivantes:

- ✓ La plaque a été sensibilisée avec du LAM de *M.paratuberculosis* dilué à 1/5000.
- ✓ Le test de deux sérums de contrôle: le sérum positif (++) et le sérum provenant d'un animal immunisé avec *M.phlei* dilués en série de 1/5 en 1/5 sur 8 dilutions. Les dilutions finales (avec ou sans étape d'absorption) sont: 1/5, 1/25, 1/125, 1/625, 1/3125, 1/15625, 1/78125 et 1/390625.
- ✓ La préparation du LAM de *M.phlei* pour l'étape d'absorption, a été diluée à 1/100, 1/200 et 1/400.

L'objectif ici est de choisir une dilution du LAM de *M.phlei* à utiliser tel que l'effet de l'absorption des anticorps non spécifiques soit maximal sur le sérum *M.phlei* mais que le signal du sérum positif (++) absorbé ne diminue pas trop. Le sérum *M.phlei* permet donc de contrôler l'efficacité de l'étape d'absorption.

Résultats:

Les résultats de cet ELISA LAM sont présentés figure 17.

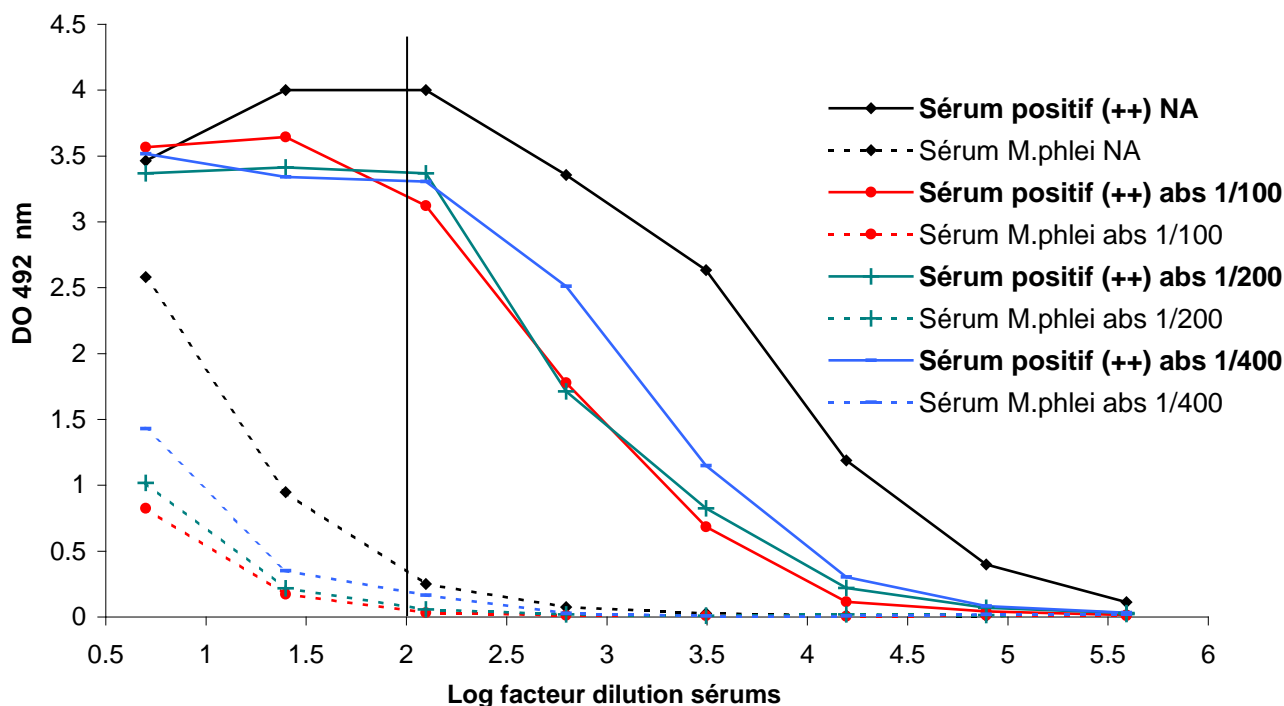


Figure 17: détermination de la dilution du LAM de *M.phlei* à utiliser. Chaque sérum a été testé non absorbé (NA) et absorbé (abs) à différentes dilutions avec le LAM de *M.phlei*.

L'interprétation des courbes obtenues afin de déterminer la dilution du LAM de *M.phlei* adéquate, repose comme précédemment sur l'allure générale des courbes et sur la dilution des sérums à 1/100.

L'étape d'absorption avec le LAM de *M.phlei* a pour effet général de diminuer le signal du sérum positif (++) et le sérum *M.phlei*. Le conjugué utilisé reconnaîtra donc une quantité inférieure d'anticorps primaires présents dans le sérum.

L'allure générale des courbes avec le sérum positif (++) montre que deux dilutions du LAM de *M.phlei* pourraient convenir, 1/100 et 1/200. Lorsque l'on regarde la dilution des sérums à 1/100, correspondant à 2 sur l'axe des abscisses, les densités optiques obtenues pour les positifs restent élevées et pour le sérum *M.phlei*, la différence entre les deux dilutions du LAM de *M.phlei* à 1/100 et 1/200 n'est pas significative.

Nous avons donc décidé d'utiliser la dilution du LAM de *M.phlei* à 1/200 pour l'étape d'absorption.

En conclusion de ce chapitre, pour les tests qui suivront nous utiliserons toujours une dilution du LAM de *M.paratuberculosis* de 1/5000 pour sensibiliser les plaques ELISA et une dilution finale pour le LAM de *M.phlei* de 1/200 pour l'étape d'absorption.

4.3. Validation des tests ELISA LAM

Présentation des sérums de contrôle:

Lors de chaque test ELISA LAM effectué, nous utilisons des sérums de contrôle pour valider le test.

Ces sérums sont les suivants:

- ✓ **Le sérum positif (++)**: il provient d'un animal infecté avec *M.paratuberculosis*.
- ✓ **Le sérum négatif**: il provient d'un animal d'une ferme indemne et il a été testé négatif à plusieurs reprises avec différents tests de diagnostic.
- ✓ **Le sérum *M.phlei***: il provient d'un animal immunisé avec *M.phlei*.

Le sérum positif et le sérum négatif servent à vérifier le bon déroulement de l'ELISA LAM.

Le sérum *M.phlei* permet de contrôler si l'étape d'absorption par le LAM de *M.phlei* a bien fonctionné.

Remarque importante: le sérum *M.phlei* ne sert en aucun cas de contrôle négatif.

Conditions d'utilisation des sérums de contrôle:

Les sérums de contrôle utilisés dans tous les ELISA LAM effectués par la suite seront dilués comme suit: les 3 sérums de contrôle ont été dilués en série de 1/5 en 1/5 pour avoir les dilutions finales (avec ou sans étape d'absorption) correspondant à 1/5, 1/25, 1/125, 1/625, 1/3125, 1/15625, 1/78125 et 1/390625.

Pour l'étape d'absorption, les sérums de contrôle seront toujours absorbés avec une dilution de 1/200 du LAM de *M.phlei*.

Résultats:

Nous présentons dans la figure 18, une illustration des résultats obtenus avec ces trois sérums de contrôle.

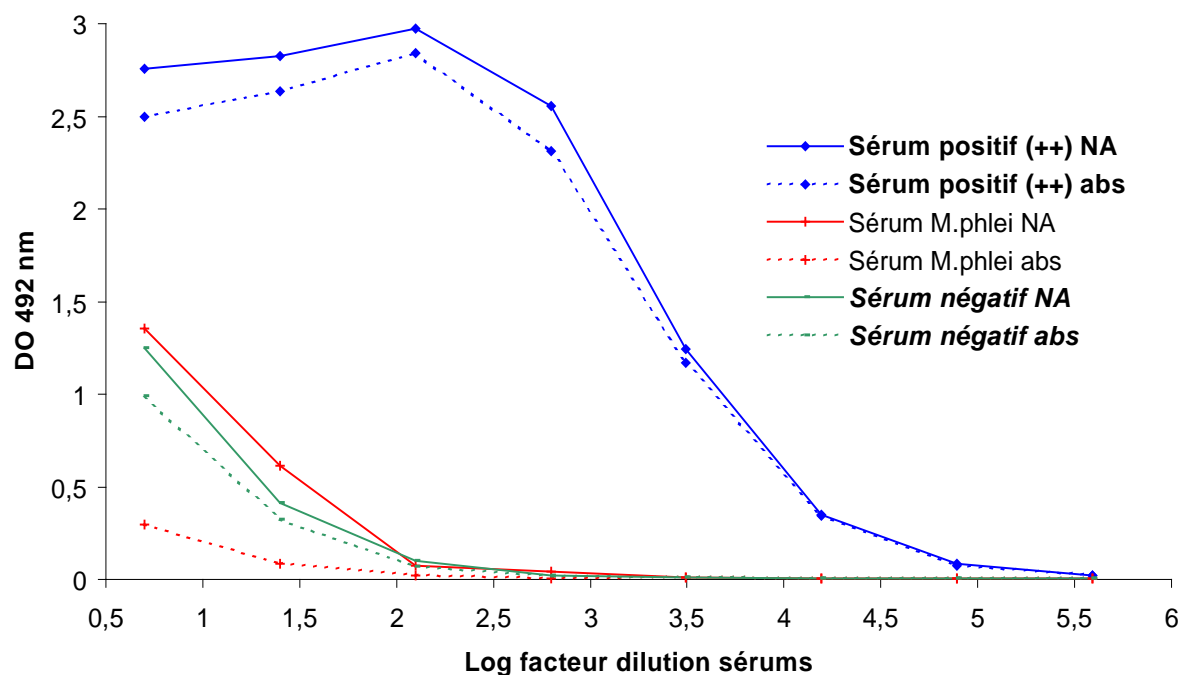


Figure 18: courbes des sérums de contrôle permettant la validation des ELISA LAM. Chaque sérum a été testé non absorbé (NA) et absorbé (abs) par le LAM de *M.phlei*.

Le sérum positif (++) doit présenter un plateau de l'ordre d'une densité optique de 3. Les ELISA LAM présentant des densités optiques inférieures à environs 2.5 n'ont pas été pris en considération et ont été refaits.

Le sérum de *M.phlei*, absorbé avec le LAM de *M.phlei* doit diminuer de façon significative comme illustré dans la figure 18 pour valider cette étape importante.

4.4. Mise au point de L'ELISA LAM sur le colostrum

Pour mettre au point et tester cet ELISA, nous avons à notre disposition dans le laboratoire tout un panel d'échantillons de colostrum provenant d'une seule et même ferme (la ferme Mi).

Cette ferme est composée d'un troupeau viandoux de 500 animaux élevés dans de bonnes conditions d'hygiène. Malgré cela, il y a trois ans apparaît un cas clinique de paratuberculose. La ferme suit alors un programme de contrôle sanitaire ayant pour objectif d'éviter l'apparition de cas clinique et de réduire l'excrétion des mycobactéries à un niveau minimal.

Le système de contrôle consiste en un prélèvement de sang sur le veau nouveau-né et un prélèvement de sang, de matières fécales et de colostrum sur les mères lors de leur vêlage.

Si la mère présente une sérologie positive au moment du vêlage ainsi que trois mois après et/ou si le veau montre des tests en INF- γ positifs, le veau est mis à l'engraissement et la mère mise sous surveillance. En cas d'apparition de cas cliniques, les animaux sont éliminés. Les échantillons de sérum, de colostrum et de matières fécales ont été prélevés sur une période de 3 ans.

Pour commencer la mise au point de L'ELISA LAM sur le colostrum, nous nous sommes basés sur le protocole de l'ELISA LAM mis au point pour les sérums (cf. matériels et méthodes) et sur le protocole de l'ELISA utilisé pour la détection d'anticorps anti-*Brucella* dans le lait (Kerkhofs *et al.*, 1990).

Nous avons testé différents facteurs tels que la préparation du colostrum, la saturation, la dilution des colostrums, l'absorption avec le LAM de *M.phlei* et l'utilisation de deux conjugués: l'anticorps 1C8 et la protéine G qui reconnaissent respectivement les anticorps de type IgG1 ou les anticorps de type IgG1, IgG2 et IgG3 de bovin.

Remarque: nous avons testé en parallèle les deux conjugués: l'anticorps 1C8 et la protéine G lors de tous les tests qui vont suivre. Mais pour une raison de clarté de cet exposé et parce que l'anticorps 1C8 donne des résultats inférieurs à ceux de la protéine G, nous n'avons présenté que les résultats obtenus avec la protéine G.

4.4.1. Données préliminaires

Les colostrums présentés ici seront utilisés tout au long de la mise au point de l'ELISA LAM sur le colostrum. Ces derniers ont subi un traitement de base qui est l'écémage, quels que soient les tests effectués.

Colostrums utilisés:

Pour effectuer ces tests, nous avons sélectionné 9 colostrums provenant de la ferme Mi présentant les caractéristiques suivantes:

- ✓ Ils ont tous été prélevés le même jour (le 07/02/02).
- ✓ Le sérum de l'un des animaux est positif avec l'ELISA commercialisé par la firme Pourquier (l'animal n°620).
- ✓ Les quantités de ces colostrums semblaient suffisantes pour la mise au point de l'ELISA (les quantités des autres colostrums de notre banque sont nettement inférieures).

L'écémage:

Les colostrums sont tout d'abord écémés par simple centrifugation (cf. matériels et méthodes). Cette étape permet d'éliminer un maximum de lipides pouvant gêner la réaction antigènes-anticorps. Cette étape, même si elle n'est pas toujours mentionnée, sera toujours effectuée.

4.4.2. Comparaison des comportements du lait écémé UHT et du colostrum dans l'ELISA LAM

Nous avons décidé de faire un premier test ELISA LAM en utilisant du lait écémé UHT commercial et des colostrums. Si le lait écémé UHT commercial se comporte de la même façon que le colostrum, nous pourrions l'utiliser pour effectuer certains des tests de la mise au point de l'ELISA LAM en ayant une grande quantité à notre disposition, en effet les quantités de colostrums disponibles sont limitées.

Pour commencer cette mise au point, nous avons inoculé artificiellement le lait écémé UHT avec des sérums de contrôle afin d'analyser l'influence de la matrice. Nous avons donc testé en parallèle l'effet du lait écémé UHT dilué au 1/2 sur les sérums de contrôle, ainsi que les colostrums dilué au 1/2.

La dilution de 1/2 a été choisie car elle est utilisée dans le protocole de l'ELISA pour la détection d'anticorps anti-*Brucella* dans le lait (Kerkhofs *et al.*, 1990).

Réalisation du test:

Afin de réaliser ce test ELISA LAM, nous avons utilisé trois sérums de contrôle (le sérum positif (++), le sérum positif (+), le sérum négatif) et du lait écémé UHT.

- ✓ Une première dilution des sérums a été effectuée dans du tampon PBS-Tween80-HC concentré 2 fois par rapport à la solution décrite dans le protocole de l'ELISA LAM (cf. matériels et méthodes). Les dilutions intermédiaires obtenues sont les suivantes: 1/5, 1/50 1/500 et 1/5000. Les sérums dilués ainsi seront de nouveau dilués au 1/2 avec le lait écémé UHT de façon à obtenir les dilutions finales de 1/10, 1/100, 1/1000 et 1/10000.
- ✓ Le lait écémé, quelque soit la dilution des sérums, est toujours dilué au 1/2. Ce dernier a été directement utilisé sans traitement ni dilution préalable.

En parallèle, 5 colostrums précédemment décrits ont été testés dilués au 1/2 dans du tampon PBS-Tween80-HC (cf. matériels et méthodes).

Résultats:

Les résultats obtenus avec le lait écémé sont très différents de ceux obtenus avec les colostrums: les courbes de la figure 19 montrent que l'effet du lait écémé sur les sérums de contrôle est une diminution de la densité optique.

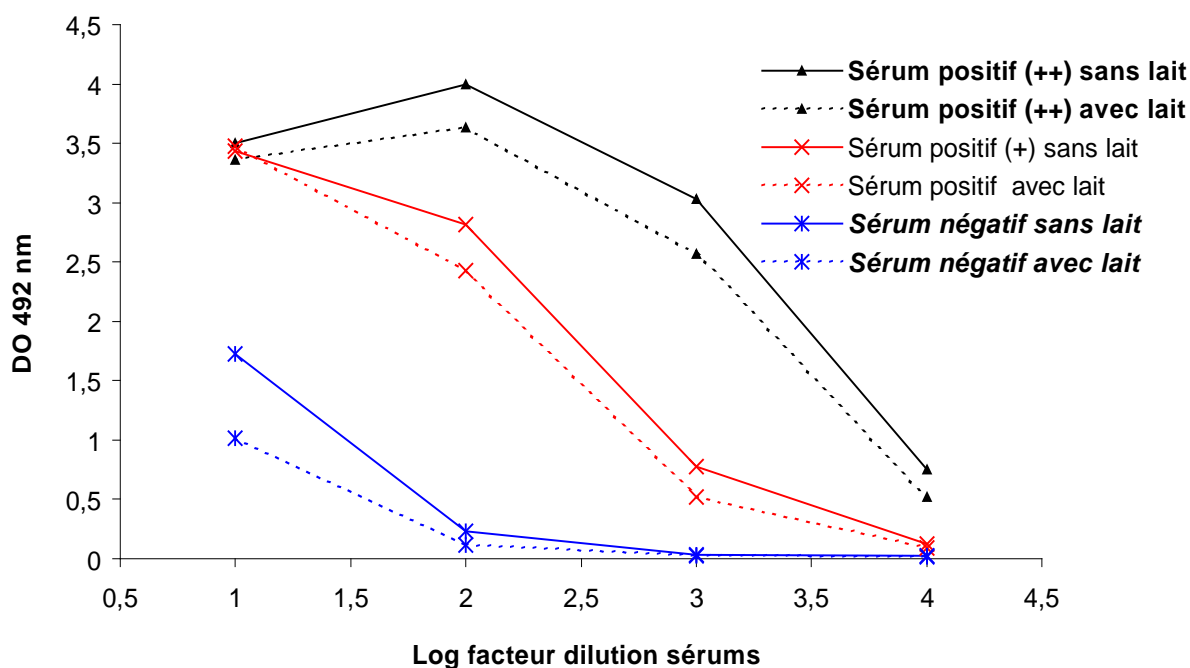


Figure 19: effet du lait écrémé UHT commercial sur trois sérums de contrôle.

Les valeurs obtenues avec les différents colostrums présentés dans le tableau 2 sont très élevées suggérant des fixations aspécifiques générant un bruit de fond.

n° animal	620	650	640	692	664
Densité optique à 492 nm des colostrums écrémés dilués 1/2	4	2.69	2.11	2.642	3.408

Tableau 2: densités optiques obtenues par le test ELISA LAM sur des colostrums dilués à 1/2.

L'effet du lait écrémé UHT et l'effet du colostrum sont très différents l'un de l'autre: le colostrum pourrait apporter du bruit de fond ce qui ne semble pas être le cas pour le lait écrémé. L'effet de matrice entre le colostrum et le lait écrémé UHT est différent.

Pour comprendre ces premiers résultats, nous avons essayé de déterminer l'intensité du bruit de fond maximal généré par le lait écrémé et le colostrum. Pour ceci, nous avons réalisé l'ELISA suivant:

- ✓ Pas de sensibilisation de la plaque ELISA par l'antigène (LAM de *M.paratuberculosis*).
- ✓ Colostrum et lait écrémé UHT non dilués.

Les résultats présentés dans le tableau 3 montrent que le lait écrémé UHT ne produit pas de bruit de fond contrairement aux colostrums.

n° animal	620	650	640	692	664	Lait écrémé UHT	
Densité optique à 492 nm des colostrums écrémés non dilués	0.098	0.390	0.415	0.06	0.305	0.005	0.009

Tableau 3: densités optiques correspondant au bruit de fond obtenu pour le lait écrémé UHT et les colostrums non dilués.

Puisque le lait écrémé commercial ne se comporte pas de la même façon que le colostrum, nous avons donc conclu qu'il n'était pas possible d'utiliser le lait écrémé commercial pour commencer la mise au point de l'ELISA.

Nous allons effectuer la mise au point de l'ELISA LAM avec les colostrums qui sont à notre disposition. Le principal problème à cette mise au point semble être la présence d'un bruit de fond élevé. Pour diminuer ce signal très important trois alternatives se présentent à nous:

- ✓ Le traitement des colostrums.
- ✓ La saturation en étape préliminaire de l'ELISA LAM.
- ✓ Les dilutions des colostrums.

4.4.3. Traitement à la présure

Le traitement à la présure est utilisé par certains laboratoires travaillant sur les colostrums dans le but de diminuer le bruit de fond des tests ELISA détectant des antigènes viraux. Nous avons donc choisi de tester ce traitement pour l'ELISA LAM.

Action de la présure:

Le lait contient des caséines (elles représentent à elles seules 80% des protéines totales) qui sont insolubles dans l'eau, les autres sont des protéines solubles (lactoglobulines et lactalbumines).

Les caséines sont en suspension colloïdale dans le lait et ce sont elles qui donnent la couleur blanche à ce dernier. Les micelles de caséine sont formées de sous-unités dont la caséine kappa qui a un rôle de stabilisation dans le maintien de la suspension colloïdale. C'est à ce niveau que la chymosine va intervenir et couper la caséine kappa en deux donnant un peptide soluble et un autre insoluble. Cette scission déstabilise les micelles et permet la formation d'un réseau insoluble par l'intervention d'ions calcium présents dans le milieu.

Traitement des colostrums:

Pour le traitement du colostrum, nous avons utilisé une présure végétale contenant essentiellement de la chymosine.

Le traitement à la présure a été réalisé (cf. matériels et méthodes) sur le colostrum déjà écrémé pendant 3h à 37°C, puis le caillot obtenu est éliminé et seul le surnageant sera testé en ELISA LAM.

Résultats:

L'ELISA LAM a été réalisé de la façon suivante:

- ✓ Dilution des colostrums au 1/2.
- ✓ Pas d'étape d'absorption avec le LAM de *M.phlei*.

Les résultats sont présentés tableau 4. Les densités optiques obtenues montrent que le traitement des colostrums à la présure ne semble pas améliorer le test ELISA comparé aux colostrums seulement écrémés mais pour confirmer ce résultat, ce traitement à la présure sera retesté par la suite.

n° animal	620	650	640	692	664	663	679
Colostrums écrémés DO à 492 nm	4	2.69	2.113	2.642	3.408	2.882	3.56
Colostrums traités à la présure DO à 492 nm	4	2.927	2.21	2.87	3.696	2.988	2.568

Tableau 4: comparaison des deux traitements des colostrums: les colostrums écrémés et les colostrums écrémés et traités à la présure, (DO: densités optiques).

4.4.4. La saturation

Rôle de la saturation:

La saturation sert à prévenir l'absorption non spécifique provenant des échantillons testés. Deux méthodes peuvent être utilisées:

- ✓ L'addition d'une grande concentration d'une substance inerte immunologiquement dans le tampon de dilution des échantillons. Ces substances ne réagissent pas avec l'antigène absorbé sur la plaque ni avec le conjugué utilisé. Ils agissent par compétition avec les facteurs non spécifiques des échantillons pour les sites disponibles sur le plastic.
- ✓ L'addition d'agents de saturation dans une étape précédente le dépôt des échantillons sur la plaque ELISA. Cela agit en augmentant l'action bloquante des agents de saturation.

C'est cette dernière étape de saturation qui sera testée ici.

Les meilleures conditions de saturation pour un ELISA donné sont déterminées par l'expérimentation. Un agent de saturation dans des conditions données pour un ELISA peut être tout à fait inefficace pour un autre ELISA.

Nous avons donc testé deux agents saturants (l'hydrolysate de caséine et la sérum albumine bovine) dans deux conditions différentes (une incubation de 3h 30 min à 37°C suivie d'une incubation à 4°C ou une simple incubation de 1 h à 37°C).

Colostrums utilisés:

7 colostrums ont été utilisés pour tester l'effet de la saturation, les deux préparations de colostrum ont été utilisées:

- ✓ Les colostrums écrémés.
- ✓ Les colostrums écrémés et traités avec la présure 3h à 37°C.

Pour la réalisation de ce test ELISA LAM, deux agents de saturation ont été utilisés: la BSA à 1% et l'hydrolysate de caséine à 5 g/l.

Densités optiques obtenues à 492 nm								
Colostrum	Pas de saturation		Saturation BSA 1% 3h à 37°C + une nuit à 4°C		Saturation HC 5g/l 3h à 37°C + une nuit à 4°C		Saturation HC 5g/l 1 heure à 37°C	
	écrémé	présure	écrémé	présure	écrémé	présure	écrémé	présure
640	2.11	2.21	1.6	1.6	1.705	1.73	1.51	1.313
663	2.882	2.988	2.227	2.232	1.99	2.124	1.945	1.799
650	2.69	2.988	1.901	2.164	1.805	1.956	1.837	2.314
664	3.408	3.696	2.789	2.86	2.732	2.881	2.504	2.47
692	2.642	2.87	1.799	1.896	1.705	1.751	1.91	1.813
679	3.56	2.568	2.75	2.847	2.735	2.894	2.768	2.927
620	4	4	3.051	3.257	3.004	3.21	2.979	3.467

Tableau 5: résultats de l'effet des différentes saturations utilisées sur les colostrums dilués au 1/2. (BSA: serum albumine bovine, HC: hydrolysate de caséine).

Dans un premier temps, nous avons comparé l'effet des deux agents de saturation avec une incubation de 3h30 à 37°C suivie d'une seconde incubation d'une nuit à 4°C sur les colostrums écrémés (tableau 5). Cette comparaison indique que l'étape de saturation diminue le bruit de fond: la saturation avec

l'hydrolysate de caséine ou la BSA montre une diminution moyenne des densités optiques de 0.5. Les deux agents de saturation montrent une action qui semble identique. D'après ces résultats, nous avons décidé de garder comme agent saturant l'hydrolysate de caséine, que nous utilisons déjà dans les tampons de dilution de l'ELISA LAM.

Dans un deuxième temps, nous avons comparé deux temps différents de saturation de l'hydrolysate de caséine (3h30 à 37°C et une nuit à 4°C ou simplement 1h à 37°C) afin de déterminer si nous pouvions utiliser un temps plus court. Les résultats obtenus tableau 5 montrent que l'effet de l'hydrolysate de caséine utilisé à 1h à 37°C ou à 3h30 à 37°C suivit d'une nuit à 4°C est globalement le même.

Remarque: la saturation a le même effet sur les deux préparations de colostrum, c'est à dire les colostrums préparés par un simple écrémage et ceux préparés par le traitement à la présure.

En conclusion la BSA et l'hydrolysate de caséine ont le même effet saturant, le temps de saturation de l'hydrolysate de caséine de 1h à 37°C est aussi efficace que 3h30 à 37°C et une nuit à 4°C et enfin il n'y a pas d'effet particulier de la saturation sur les colostrums traités à la présure par rapport aux colostrums écrémés.

Pour la suite des expériences nous utiliserons toujours la saturation 1h à 37°C avec l'hydrolysate de caséine.

4.4.5. Dilution en série des colostrums

➤ Présentation des profils de dilution du colostrum

La troisième méthode nous permettant de diminuer le bruit de fond est la dilution des échantillons. Nous devons déterminer une dilution optimale pour une bonne détection des échantillons positifs sans un bruit de fond important pour les échantillons négatifs.

Réalisation du test:

Les conditions suivantes ont été testées:

- ✓ Saturation de la plaque ELISA 1 heure à 37°C avec l'hydrolysate de caséine 5 g/l.
- ✓ Les sérums de contrôle utilisés sont: le sérum positif (++) et le sérum négatif.
- ✓ Les sérums de contrôle et les colostrums écrémés ont été dilués en série afin d'obtenir les dilutions suivantes : 1/5, 1/25, 1/125, 1/625, 1/3125, 1/15625, 1/78125 et 1/390625.
- ✓ Il n'y a pas d'étape d'absorption par le LAM de *M.phlei*.

Résultats:

Les résultats obtenus présentés figure 20 montrent clairement qu'il y a une diminution des densités optiques directement liée aux dilutions en série des colostrums.

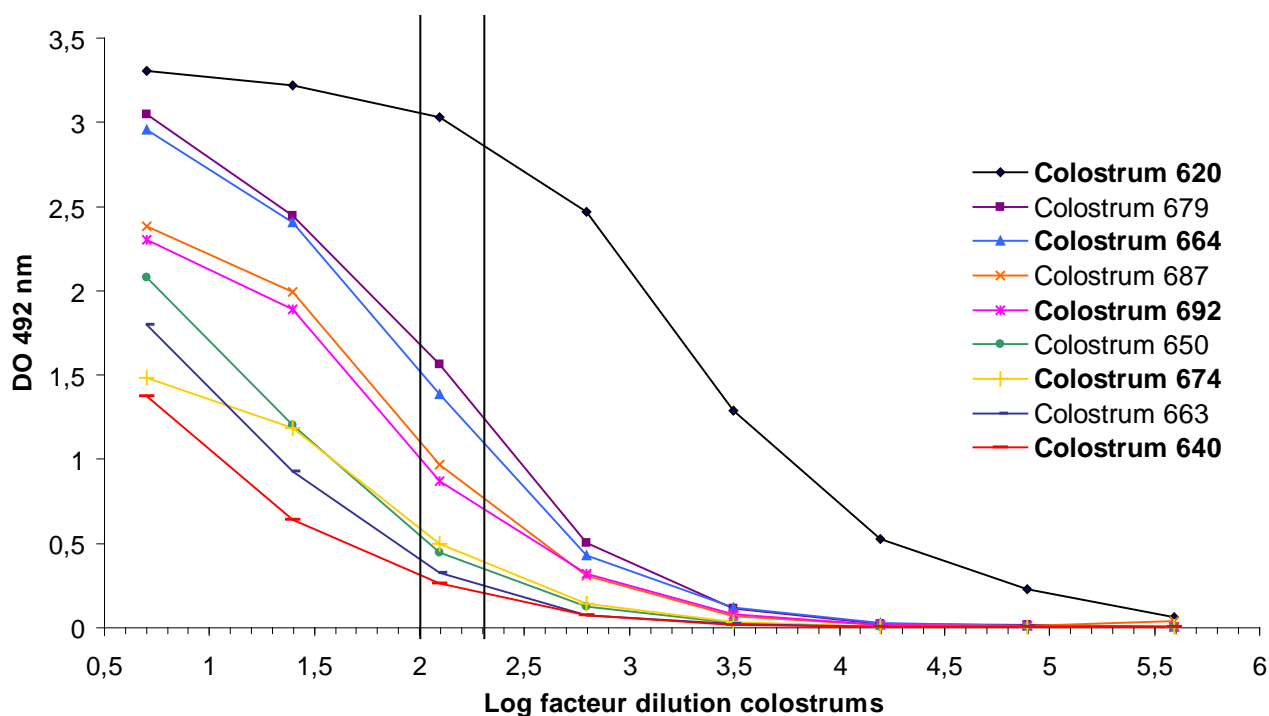


Figure 20: résultats de l'ELISA LAM sur les colostrums dilués en série.

Mais nous avons des allures de courbes différentes selon le colostrum testé :

- ✓ Le colostrum de l'animal n° 620, a une courbe qui présente un plateau et qui croise l'axe des abscisses à une dilution élevée montrant que le titre en anticorps est élevé. On peut noter que cet animal a été testé séropositif avec l'ELISA de la firme Pourquier.
- ✓ Les colostrums des autres animaux présentent une série de courbes sans plateau, dont les densités optiques diminuent plus vite avec les dilutions que celle du colostrum de l'animal n° 620. De plus ces courbes croisent l'axe des abscisses à des valeurs moins élevées que l'animal n° 620.

Les dilutions des colostrums envisagées pour obtenir un signal optimal sont 1/100 et 1/200. Ces dilutions ont été choisies de telle sorte que l'écart entre le signal obtenu pour le colostrum de l'animal n° 620 et n° 640 soit le plus grand tout en ayant le minimum de signaux avec le n° 640. Le colostrum de l'animal n° 620 a le titre le plus élevé tandis que celui de l'animal n° 640, le plus faible.

Pour montrer l'efficacité de la dilution sur les fixations aspécifiques provoquant le bruit de fond, les colostrums ont été testés non dilués, dilués à 1/100 et 1/200 dans les puits d'une plaque ELISA non sensibilisés avec l'antigène LAM de *M.paratuberculosis*. Les densités optiques obtenues sont présentées tableau 6.

n° animal	620	687	650	664	640	692
Colostrums purs	0.767	1.244	1.201	0.656	0.536	0.129
Colostrums dilués à 1/100	0.015	0.011	0.025	0.101	0.024	0.037
Colostrums dilués à 1/200	0.058	0.037	0.055	0.052	0.018	0.027

Tableau 6: densités optiques correspondant au bruit de fond obtenu pour les colostrums non dilués, dilué à 1/100 et à 1/200.

Ces résultats montrent qu'avec les dilutions envisagées et la saturation d'une heure à l'hydrolysate de caséine, nous n'avons plus de problème lié à un éventuel bruit de fond.

➤ Effet du traitement présure sur les dilutions de colostrum

Comme les dilutions semblent être un bon facteur pour effectuer l'ELISA LAM, nous avons testé à nouveau le traitement à la présure.

Parmi tous les colostrums précédemment montrés, nous avons choisi de tester le colostrum des animaux suivants: le n° 620, le n° 640, le n° 650, le n° 664 et le n° 692. Ces colostrums ont été choisis parce qu'ils montraient différentes allures de courbes.

Les colostrums écrémés et les mêmes colostrums traités à la présure ont été testés dilués en série.

Réalisation du test

Voici les conditions de l'ELISA LAM réalisé:

- ✓ Saturation 1h à 37°C avec l'hydrolysate de caséine 5 g/l.
- ✓ Les sérums de contrôle utilisés sont: le sérum positif (++) et le sérum négatif.
- ✓ Les dilutions finales effectuées sur les sérums et les colostrums sont: 1/5, 1/25, 1/125, 1/625, 1/3125, 1/15625, 1/78125 et 1/390625.

Résultats

Le résultat de l'ELISA LAM est présenté figure 21. Les colostrums traités à la présure comparés aux colostrums écrémés présentent des résultats très peu différents les uns des autres. En effet, la variation des résultats que l'on observe sur les colostrums traités ou non à la présure est minime et non significative.

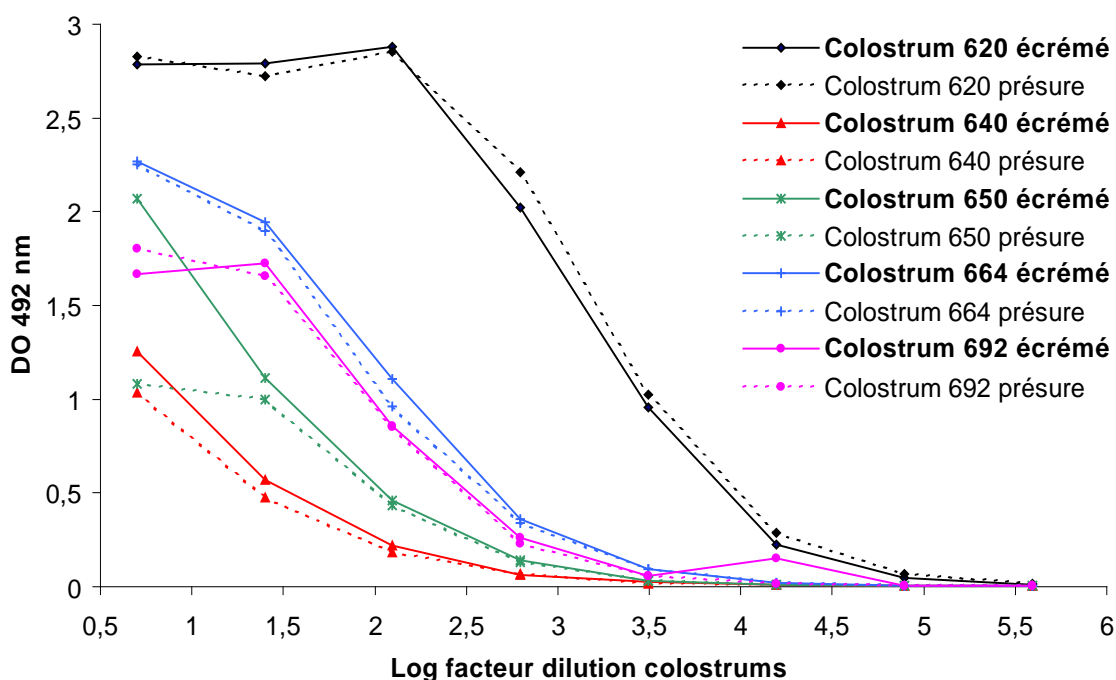


Figure 21: effet du traitement présure sur les colostrums dilués en série.

4.4.6. Absorption des échantillons avec le LAM de *M.phlei*

L'étape d'absorption avec le LAM de *M.phlei* est une étape obligatoire de l'ELISA LAM. Elle permet d'augmenter la spécificité de ce test. Nous allons donc tester cette étape d'absorption sur les colostrums dilués.

Tous les colostrums écrémés ont été testés. Mais par souci de clarté, seuls les résultats obtenus avec trois colostrums montrant des allures de courbes représentatives de l'ensemble des colostrums seront présentés. Il s'agit du colostrum de l'animal n° 620, n° 640 et n° 664.

Réalisation du test:

- ✓ Saturation 1h à 37°C avec l'hydrolysate de caséine.
- ✓ Colostrums testés: les 9 colostrums disponibles.
- ✓ Les sérums de contrôle utilisés sont: le sérum positif (++) et le sérum *M.phlei*.
- ✓ Les dilutions finales effectuées sur les sérums et les colostrums écrémés sont les suivantes: 1/5, 1/25, 1/125, 1/625, 1/3125, 1/15625, 1/78125 et 1/390625.
- ✓ Le LAM de *M.phlei* a été utilisé à une dilution finale de 1/200.

Résultats:

Les résultats sont présentés figure 22.

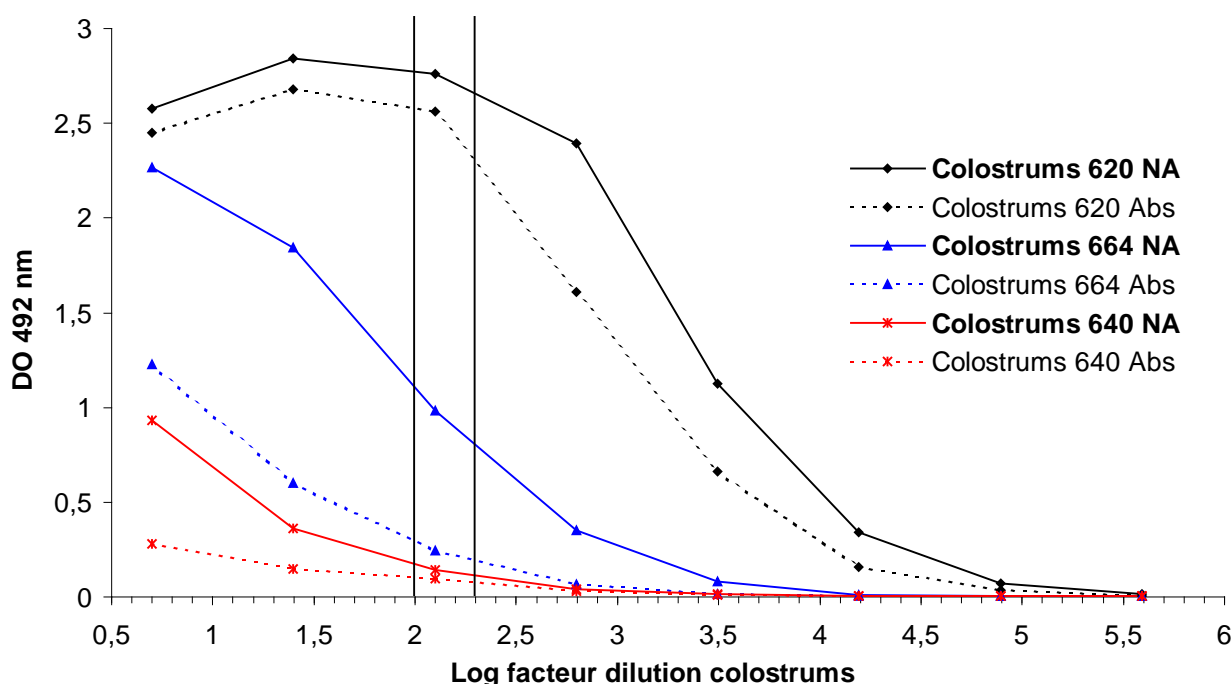


Figure 22: Effet de l'absorption avec le LAM de *M.phlei* sur les colostrums écrémés. Chaque colostrum a été testé non absorbé (NA) et absorbé (abs) par le LAM de *M.phlei*.

Après absorption, nous observons une forte diminution de la densité optique des différents colostrums, surtout pour le colostrum de l'animal n° 664. L'effet est moindre pour les colostrums de l'animal n° 620 et n° 640. Ces résultats reproduisent ceux observés avec les sérums en général et montrent l'efficacité de cette étape:

- ✓ Le colostrum de l'animal n° 620 se comporte comme un échantillon positif avec une densité optique élevée, un effet plateau et un titre apparent élevé (cet animal présente une sérologie positive en ELISA de la firme Pourquier).
- ✓ Le colostrum de l'animal n° 640 semble plutôt se comporter comme un échantillon négatif avec des densités optiques peu élevées pour de faibles dilutions, pas d'effet plateau et un titre apparent peu élevé.
- ✓ Le colostrum de l'animal n° 664 est plus intermédiaire et pour l'instant nous n'essayerons pas de l'analyser en détail.

Ces courbes nous ont donc permis de déterminer les dilutions qui pourraient convenir pour le test.

Comme les résultats obtenus avec les colostrums lors de cette étape d'absorption sont semblables à ceux obtenus avec les sérums, nous avons décidé de garder les conditions d'absorption, sans mise au point supplémentaire.

Les dilutions envisagées des colostrums pour le test ELISA LAM sont 1/100 et 1/200

4.4.7. Conclusion de la mise au point de l'ELISA LAM sur le colostrum

Le test des colostrums avec l'ELISA LAM sera effectué dans les conditions suivantes:

- ✓ La préparation des colostrums par écrémage,
- ✓ La saturation à l'hydrolysate de caséine 1 heure à 37°C
- ✓ L'étape d'absorption avec le LAM de *M.phlei*
- ✓ Utilisation de la protéine G comme conjugué.
- ✓ Dilution des colostrums à 1/100 et 1/200

Le protocole établi est présenté dans l'encadré. Dans ce protocole il ne reste plus qu'à choisir entre la dilution 1/100 et 1/200 des colostrums.

Remarque: le protocole présenté dans l'encadré est aussi valable pour les sérums qui sont utilisés à une dilution finale de 1/100.

Protocole intermédiaire de l'ELISA LAM mis au point sur les colostrums

Sensibilisation des plaques

Diluer le LAM (1/5000) en tampon citrate.

Déposer 50 µl par puits, couvrir la plaque à l'aide d'un couvercle ou d'un adhésif et incubé une nuit à 4°C.

Lavage

Laver 4 fois la plaque avec 300 µl par puits de PBS-Tween20.

Saturation

Déposer 200 µl par puits de la solution d'hydrolysate de caséine à 5 g/l.

Incuber 1 heure à 37°C.

Lavage

Laver 4 fois la plaque avec 300 µl par puits de PBS-Tween20.

Echantillons:

Absorption des colostrums avec du LAM de *M.phlei*

Les colostrums à tester sont dilués à une dilution finale de 1/100 et 1/200 en présence du LAM de *M.phlei* dilué à une dilution finale de 1/200 dans du PBS-Tween80 + HC.

Incubation:

Incuber 30 minutes sous agitation à température ambiante dans une microplaque de dilution par exemple. Couvrir la plaque (couvercle, papier aluminium ou adhésif).

Déposer 50 µl de colostrum absorbé ou non par puits de la plaque ELISA, incubé 1h à température ambiante. Couvrir la plaque.

Lavage

Laver 4 fois la plaque avec 300 µl par puits de PBS-Tween20.

Conjugué: détection des anticorps de bovins

Diluer la protéine G marquée à la peroxydase 1/5000 en PBS-Tween80 + HC.

Déposer 50 µl par puits, incubé 1h à température ambiante. Couvrir la plaque.

Lavage

Laver 4 fois la plaque avec 300 µl par puits de PBS-Tween20 0.1%.

Révélation

Préparer la solution de révélation : 1 pastille OPD dans 25 ml de tampon phosphate citrate + 5 µl H₂O₂.

100 µl de la solution de révélation sont ajoutés par puits.

Incuber 20 minutes dans le noir. Couvrir la plaque.

Stopper la révélation avec 25 µl de H₂SO₄ 2 M par puits.

Lire les densités optiques en bichromatique à 492 nm et 620nm.

4.5. Test des colostrums

Le test des colostrums par l'ELISA LAM mis au point, va permettre de définir la dilution des colostrums à utiliser (1/100 ou 1/200), et de comparer les résultats obtenus par l'ELISA LAM sur le colostrum et le sérum d'un même animal.

4.5.1. Présentation des résultats

La mise au point étant faite, nous allons tester des échantillons de colostrum et de sérum prélevés sur les bovins de la ferme Mi décrite au chapitre 4.4 en ELISA LAM.

Les résultats (tableaux 7 A et B pages suivantes) sont présentés par dossier composé d'un groupe d'animaux dont les prélèvements de sérum et de colostrum ont été effectués le même jour. Nous avons testé 6 dossiers différents constitués d'échantillons de sérum et de colostrum de 71 animaux.

Pour les échantillons d'un même dossier, le test ELISA LAM a été réalisé le même jour avec le sérum dilué à 1/100 et le colostrum correspondant dilué à 1/100 et 1/200. Ces échantillons ont été testés absorbés ou non avec le LAM de *M.phlei*.

Lors de l'écémage de tous ces colostrums, les crèmes et les culots ont été ensemencés sur les milieux HEYM avec ou sans mycobactine J (cf. matériels et méthodes). Les résultats ne seront connus que dans 6 mois. Ces colostrums n'avaient jamais été testés en culture et permettront de mettre en relation les résultats des tests ELISA LAM sur les colostrums avec la mise en culture de ces derniers.

Les tableaux de résultats indiquent les sérologies obtenues avec l'ELISA commercialisé par la firme Pourquier, l'ELISA commercialisé par la firme IDEXX (cf. matériels et méthodes) et de l'ELISA LAM dont les densités optiques sont indiquées pour chaque échantillon.

L'interprétation de l'ELISA LAM sur les sérums est la suivante :

- ✓ Lorsqu'un échantillon montre une densité optique supérieure à 0.5, cet échantillon est positif.
- ✓ Lorsque la densité optique est inférieure à 0.5, l'échantillon est négatif.

Pour les colostrums, l'interprétation n'est pas possible tant que la détermination des cut-off et le choix de la dilution n'ont pas été effectués.

Remarque: la détermination du cut-off en ELISA LAM se fait uniquement sur les sérums et les colostrums absorbés avec le LAM de M.phlei. Les densités optiques des échantillons non absorbés sont données à titre indicatif et donne une idée de l'effet de cette étape.

Dossier: 2000/00140 date 29/03/00								
ELISA LAMn								
n° animal	Sérologie ELISA IDEXX	Résultats Sérum	Sérum 1/100 NA	Sérum 1/100 Abs	Colostrum 1/100 NA	Colostrum 1/100 Abs	Colostrum 1/200 NA	Colostrum 1/200 Abs
			DO	DO	DO	DO	DO	DO
405	-	-	0.046	0.022	0.209	0.053	0.112	0.029
315	-	-	0.52	0.11	2.649	0.807	2.17	0.532
229	+	-	0.831	0.16	1.1	0.192	0.684	0.099
284	+	-	0.139	0.065	Pas de colostrum			
275	+	+	3.177	3.348	3.676	3.34	3.475	3.37
560	-	-	0.53	0.15	1.465	0.246	0.927	0.149
558	-	-	0.063	0.022	0.134	0.043	0.073	0.022
Dossier: 2000/00071 date 28/02/00								
ELISA LAMn								

n° animal	Sérologie ELISA IDEXX	Résultats Sérum	Sérum 1/100 NA	Sérum 1/100 Abs	Colostrum 1/100 NA	Colostrum 1/100 Abs	Colostrum 1/200 NA	Colostrum 1/200 Abs
			DO	DO	DO	DO	DO	DO
348	-	-	0.406	0.139	0.875	0.133	0.529	0.083
422	-	-	0.087	0.057	0.564	0.157	0.302	0.111
302	-	-	0.461	0.115	1.334	0.279	0.726	0.151
510	-	-	0.152	0.046	1.665	0.119	1.037	0.077
520	-	-	0.06	0.042	0.404	0.102	0.249	0.061
361	-	-	0.158	0.053	0.658	0.1	0.405	0.078
110	-	-	0.11	0.055	0.987	0.224	0.699	0.154
482	+	+	3.634	3.037		Pas de colostrum		

Dossier: 2002/0089AS date 07/02/02

ELISA LAMn					
n° animal	Sérologie Pourquier	Colostrum 1/100 NA	Colostrum 1/100 Abs	Colostrum 1/200 NA	Colostrum 1/200 Abs
		DO	DO	DO	DO
640	-	0.201	0.113	0.116	0.082
663	-	0.316	0.119	0.169	0.079
674	-	0.373	0.135	0.241	0.066
687	-	1.006	0.214	0.615	0.132
676	-	0.707	0.2899	0.353	0.168
650	-	0.437	0.171	0.257	0.105
664	-	1.463	0.417	0.86	0.23
620	+	3.367	2.995	3.44	2.773
692	-	0.893	0.215	0.515	0.109
679	-	1.157	0.272	0.696	0.101

Dossier: 2000/00003 date 05/01/00

ELISA LAMn								
n° animal	Sérologie ELISA IDEXX	Résultats Sérum	ELISA: sérum 1/100 NA	ELISA: sérum 1/100 Abs	ELISA: colostrum 1/100 NA	ELISA: colostrum 1/100 Abs	ELISA: colostrum 1/200 NA	ELISA: colostrum 1/200 Abs
			DO	DO	DO	DO	DO	DO
272	-	-	0.578	0.267	0.635	0.097	0.334	0.069
330	-	-	0.368	0.133	0.48	0.138	0.268	0.082
338	-	-	0.365	0.237	0.498	0.112	0.343	0.081
431	+	+	1.881	1.788	2.029	1.583	1.442	1.146
460	-	-	0.305	0.112	0.601	0.242	0.393	0.154
481	-	-	0.38	0.114	0.912	0.171	0.579	0.106
496	-	+	1.037	0.639	1.741	1.143	1.345	0.881
526	+	+	2.587	1.402	3.26	2.205	3.104	1.686
528	-	-	0.424	0.133	0.529	0.159	0.322	0.159

Tableau 7 A: résultats des ELISA LAM effectués sur les sérums et les colostrums des animaux de la ferme Mi.

Dossier: 2000/00182 date 21/04/00

ELISA LAMn								
n° animal	Sérologie ELISA IDEXX	Résultats Sérum	ELISA: sérum 1/100 NA	ELISA: sérum 1/100 Abs	Colostrum 1/100 NA	Colostrum 1/100 Abs	Colostrum 1/200 NA	Colostrum 1/200 Abs
			DO	DO	DO	DO	DO	DO
483	-	-	0.129	0.056	0.167	0.065	0.075	0.035
518	-	-	0.041	0.023	0.423	0.201	0.266	0.162
563	+	-	0.356	0.096	1.67	0.344	1.21	0.234
500	-	+	0.874	0.695	2.543	2.49	2.336	2.132
521	-	+	0.72	0.564	0.721	0.551	0.408	0.337

281	-	-	0.715	0.103	1.849	0.532	1.393	0.349
566	-	-	0.12	0.023	0.619	0.087	0.389	0.044
548	-	-	0.293	0.116	0.761	0.217	0.474	0.139
557	-	-	0.02	0.014	0.292	0.118	0.201	0.095
287	-	-	0.173	0.028	0.859	0.133	0.515	0.084
474	-	-	0.085	0.043	0.223	0.104	0.13	0.073
550	-	-	0.173	0.056		Pas de colostrum		
271	-		Pas de	sérum	2.475	1.304	2.186	0.881
400	-	-	0.187	0.08	0.065	0.029	0.038	0.018
243	-	-	0.208	0.05	0.876	0.182	0.514	0.111
468	+	+	1.142	0.766	3.132	2.664	2.621	2.18
555	-	-	0.036	0.04	0.355	0.431	0.221	0.31
466	-	-	0.092	0.054	0.387	0.174	0.24	0.119
270	-	-	0.291	0.068	1.67	0.382	1.347	0.242
536	-	-	0.039	0.011	0.051	0.011	0.023	0.008
378	-	-	0.702	0.079	2.758	0.594	2.399	0.369
407	-	-	0.093	0.035	0.99	0.025	0.049	0.015
424	-		Pas de	sérum	1.174	0.583	0.963	0.341
454	-	-	0.143	0.038	0.865	0.221	0.499	0.135
245	-	-	0.708	0.139	1.857	0.607	1.633	0.465
Dossier: 2000/00123 date 22/03/00/00								
ELISA LAMn								
n° animal	Sérologie ELISA IDEXX	Résultats Sérum	ELISA: sérum 1/100 NA	ELISA: sérum 1/100 Abs	ELISA: colostrum 1/100 NA	ELISA: colostrum 1/100 Abs	ELISA: colostrum 1/200 NA	ELISA: colostrum 1/200 Abs
			DO	DO	DO	DO	DO	DO
225	-	-	0.336	0.068	1.857	0.427	1.245	0.282
508	+	-	0.089	0.036	0.692	0.179	0.39	0.136
564	-	+	1.224	1.011	3.074	2.57	2.57	2.099
504	-	-	0.676	0.057	1.753	0.302	1.326	0.161
447	-	-	0.593	0.278	1.175	0.554	0.806	0.465
534	-	-	0.14	0.127	0.772	0.501	0.471	0.414
435	-	-	0.132	0.044	0.253	0.082	0.14	0.038
522	-	-	0.512	0.122	1.41	0.362	0.937	0.239
543	-	-	0.086	0.041	0.575	0.196	0.332	0.138
562	-	-	0.388	0.1	1.252	0.19	0.805	0.106
465	-	-	0.288	0.087	1.011	0.332	0.693	0.284
357	-	?	1.445	0.445	3.23	1.712	2.746	1.421

Tableau 7 B: résultats de l'ELISA LAM sur les sérums et les colostrums des animaux de la ferme Mi.

Abs: sérums ou colostrums absorbés par le LAM de *M.phlei*.

NA: sérums ou colostrums non absorbés avec le LAM de *M.phlei*

4.5.2. Calcul du cut-off et choix de la dilution des colostrums

Le cut-off se détermine classiquement par le test de 1000 animaux négatifs provenant de fermes indemnes de paratuberculose et de 300 animaux positifs provenant de fermes infectées par la paratuberculose (Jacobson, 2000).

La détermination de fermes indemnes de la paratuberculose est difficile, en effet contrairement à la tuberculose bovine (*M.bovis*) qui est une maladie à déclaration obligatoire et pour laquelle un statut officiel est défini, il n'existe pas de statut pour la maladie de Johne. Cependant le suivi des fermes donne déjà une bonne indication du statut.

Pour le calcul du cut-off, le choix des animaux "négatifs" repose sur deux critères:

- ✓ Les animaux étaient séronégatifs au moment de la prise de colostrum.
- ✓ *M.paratuberculosis* n'a pas été isolé dans les matières fécales de ces animaux.

Le cut-off se détermine de la façon suivante:

Moyenne des densités optiques des colostrums négatifs + 3 déviations standards

Pour les colostrums dilués à 1/100 le cut-off est de 0.75, pour ceux dilués à 1/200 le cut-off est de 0.58. Les résultats interprétés en terme de positivité et de négativité de chaque colostrum dilué à 1/100 et 1/200 sont cohérents: un colostrum positif à 1/100 l'est aussi à 1/200

Remarque: sur les 68 animaux dont les colostrums ont été testés, seul l'animal n°315 du dossier 2000/00140 est douteux: il présente un colostrum positif à 1/100 et négatif à 1/200. Les densités optiques sont pour chaque dilution très proches des cut-off: pour la dilution 1/100 la densité optique est à 0.807 (cut-off à 0.75) et pour la dilution 1/200 elle est à 0.532 (cut-off à 0.58).

Nous avons choisi d'utiliser la dilution 1/200: cette dilution donne un résultat comparable à la dilution 1/100 avec un bruit de fond moins important. Ceci est illustré figure 23 où l'on observe effectivement le décalage des résultats obtenus vers les densités optiques plus faibles.

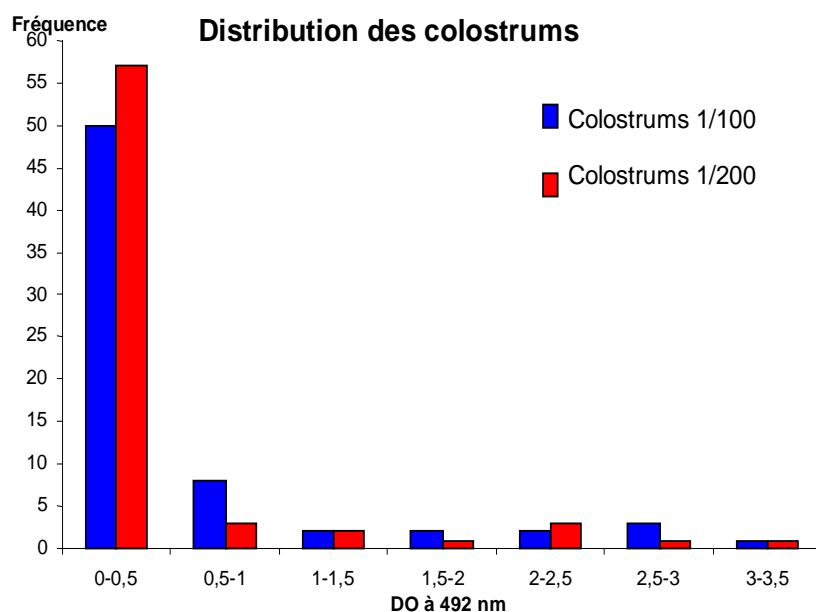


Figure 23: répartition des densités optiques obtenues avec la dilution de 1/100 et 1/200 de l'ensemble des colostrums testé.

4.5.3. Application aux résultats

Pour chaque animal, différents tests avaient déjà été effectués, ils sont rassemblés dans le tableau des résultats. Ces tests sont:

- ✓ Les tests directs effectués à partir des matières fécales (culture et coloration de Ziehl Neelsen).
- ✓ La sérologie effectuée avec l'ELISA de la firme Pourquier ou l'ELISA de la firme IDEXX dans les jours suivants le prélèvement.

Il était donc intéressant de rassembler ces différents résultats avec ceux des tests ELISA LAM effectués sur les sérums dilués à 1/100 et les colostrums dilués à 1/200 (cf. tableau 8).

Résultats:

Les résultats du tableau 8, montrent que les méthodes directes de mise en évidence de *M.paratuberculosis* dans les matières fécales (culture et coloration de Ziehl Neelsen) et les résultats des différents ELISA ne sont pas concordants.

Les résultats des tests directs sont négatifs sauf une culture positive pour l'animal n° 560 et une coloration de Ziehl Neelsen positive pour l'animal n° 275.

L'animal n° 560 a une sérologie négative en ELISA de la firme IDEXX et en ELISA LAM.

L'animal n° 275 a une sérologie positive sur les deux tests ELISA précédemment cités.

Ces résultats attestent de la pauvre sensibilité de ces méthodes à l'échelle individuelle (cf. introduction) et/ou de la faible prévalence intra troupeau, suite au programme de contrôle.

n° animal	Matières fécales: Ziehl Neelsen	Matières fécales: culture	Sérologie IDEXX	Elisa LAM sérum	Elisa LAM colostrum	n° animal	Matières fécales: Ziehl Neelsen	Matières fécales: culture	Sérologie IDEXX	Elisa LAM sérum	Elisa LAM colostrum
Dossier: 2000/00140 date 29/03/00						Dossier: 2000/00182 date 21/04/00					
405	-	-	-	-	-	483	-	-	-	-	-
315	-	-	-	-	-	518	-	-	-	-	-
229	-	-	+	-	-	563	-	-	+	-	-
284	-	-	+	-	-	500	-	-	-	+	+
275	+	-	+	+	+	521	-	-	-	+	-
560	-	+++	-	-	-	281	-	-	-	-	-
558	-	-	-	-	-	566	-	-	-	-	-
Dossier: 2000/00071 date 28/02/00						548	-	-	-	-	-
348	-	-	-	-	-	557	-	-	-	-	-
422	-	-	-	-	-	287	-	-	-	-	-
302	-	-	-	-	-	474	-	-	-	-	-
510	-	-	-	-	-	550	-	-	-	-	-
520	-	-	-	-	-	271	-	-	-	-	+
361	-	-	-	-	-	400	-	-	-	-	-
110	-	-	-	-	-	243	-	-	-	-	-
482	-	-	+	+	-	468	-	-	+	+	+
Dossier: 2000/00003 date 05/01/00						555	-	-	-	-	-
272	-	-	-	-	-	466	-	-	-	-	-
330	-	-	-	-	-	270	-	-	-	-	-
338	-	-	-	-	-	536	-	-	-	-	-
431	-	-	+	+	+	378	-	-	-	-	-
460	-	-	-	-	-	407	-	-	-	-	-

481	-	-	-	-	-	424	-	-	-	-	-
496	-	-	-	+	+	454	-	-	-	-	-
526	-	-	+	+	+	245	-	-	-	-	-
528	-	-	-	-	-	Dossier: 2000/00123 date 22/03/00/00					
n° animal	Matières fécales: Ziehl Neelsen	Matières fécales: culture	Sérologie Pourquoi	Elisa LAM sérum	Elisa LAM colostrums	225	-	-	-	-	-
Dossier: 2002/0089AS date 07/02/02						508	-	-	+	-	-
640	-	-	-	Pas de sérums	-	564	-	-	-	+	+
663	-	-	-		-	504	-	-	-	-	-
674	-	-	-		-	447	-	-	-	-	-
687	-	-	-		-	534	-	-	-	-	-
676	-	-	-		-	435	-	-	-	-	-
650	-	-	-		-	522	-	-	-	-	-
664	-	-	-		-	543	-	-	-	-	-
620	-	-	+		+	562	-	-	-	-	-
692	-	-	-		-	465	-	-	-	-	-
679	-	-	-		-	357	-	-	-	?	+

Tableau 8: résultats de l'ensemble des tests effectués sur les animaux de la ferme Mi

Comparaison des résultats ELISA LAM sérum et colostrum:

Afin de comparer l'ELISA LAM sur le colostrum avec l'ELISA LAM sur les sérums, les résultats seront mis dans une table de contingence comme présenté ci-après:

		Test 1		
		<i>positifs</i>	<i>négatifs</i>	Total
Test 2	<i>positifs</i>	A	B	n _{A+B}
	<i>négatifs</i>	C	D	n _{C+D}
	Total	n _{A+C}	n _{B+D}	N

A partir de ces résultats, les résultats des tests pourront être comparés deux à deux pour la symétrie des résultats obtenus (test Mc Nemar) ainsi que la concordance de ceux-ci (test Kappa de Cohen) (cf. matériels et méthodes).

- ✓ Le test Mc Nemar compare les valeurs C et B. L'hypothèse H_0 de départ est: les tests sont symétriques. Si $H_0 > 3.84$ alors H_0 est rejetée.
- ✓ Le test du Kappa de Cohen compare les valeurs A et D et prend en compte les différentes sommes. Si la valeur trouvée K_0 est <0 il y a absence de concordance, K_0 est <0.4 il y a absence de concordance si $0.4 < K_0 < 0.75$, il y a une bonne concordance et si $K_0 > 0.75$ la concordance est excellente.

Pour effectuer cette comparaison, seuls les animaux dont les sérums et les colostrums ont pu être testés en parallèle ont été sélectionnés: au total 56 couples sérum/colostrum ont été interprétés ici.

		ELISA LAM colostrums		
		<i>positifs</i>	<i>négatifs</i>	Total
ELISA LAM sérums	<i>positifs</i>	7	1	8
	<i>négatifs</i>	1	47	48
Total		8	48	56

Test de Mc Nemar:

Ce test n'est pas applicable, en effet la somme des paires discordantes (1 +1) n'est pas supérieure à 10.

Test du Kappa de Cohen (applicable : $N > 2.r^2$; $56 > 25$):

Le coefficient Kappa observé est 0.85. Cette valeur est supérieure à 0.75, signifiant qu'il y a une excellente concordance.

Comme $N > 25$, on peut utiliser l'approximation gaussienne: $Z^{obs} = 4.14$, la p -value est comprise entre 0.0001 et 0.00001. L'erreur de se tromper en affirmant que la concordance observée est vraiment significative se situe entre 0.01% et 0.001%: la concordance de ces résultats est donc significative et n'est pas due au hasard.

Ces premiers résultats montrent une très bonne concordance entre l'ELISA LAM réalisé sur les colostrums et l'ELISA LAM réalisé sur les sérums: 47 animaux dont les colostrums sont négatifs le sont aussi en sérologie et les 7 animaux positifs le sont à la fois pour le colostrum et pour le sérum.

Il y a seulement deux cas où il n'y a pas de correspondance:

- ✓ Le résultat donnant le sérum négatif avec le colostrum positif, (animal n°357, du dossier 2000/00123) est un résultat douteux: en effet la densité optique de ce sérum est de 0.445 qui est une valeur proche du cut-off de 0.5.
- ✓ Le résultat donnant le colostrum négatif avec le sérum positif (animal n°521, dossier 2000/00182), n'est apparemment pas douteux, ils ont été testés deux fois et les densités optiques obtenues sont les suivantes: la densité optique du sérum est de 0.564 la première fois et 0.683 la deuxième fois, le colostrum lui présentait les densités optiques suivantes: 0.337 et 0.242.

Il y a donc une bonne corrélation entre les résultats de l'ELISA LAM sérum et colostrum. Cette observation nous amène à l'hypothèse que le test ELISA LAM sur les colostrums a les mêmes qualités intrinsèques que l'ELISA LAM sur les sérums.

4.6. Comparaison sérologique de L'ELISA LAM avec l'ELISA de la firme IDEXX et l'ELISA de la firme Pourquier

L'objectif de ce chapitre est de comparer les résultats obtenus avec l'ELISA LAM, l'ELISA de la firme IDEXX et l'ELISA de la firme Pourquier grâce à des tests statistiques. En fonction des résultats de ces tests statistiques, nous pourrions avoir une idée des caractéristiques intrinsèques (sensibilité et spécificité) de l'ELISA LAM connaissant les caractéristiques intrinsèques des deux autres ELISA commerciaux. La sensibilité est la proportion d'animaux testés positifs parmi une population totale d'animaux infectés et la spécificité est la proportion d'animaux testés négatifs parmi une population d'animaux vraiment non infectés.

L'ELISA IDEXX a été le premier ELISA disponible sur le marché européen, le laboratoire a utilisé pendant un temps ce test en diagnostic de routine. Actuellement, il existe au total 5 ELISA disponibles commercialement dont fait partie le Pourquier. Ce dernier est actuellement utilisé dans le laboratoire.

Remarque: ces trois ELISA sont des ELISA indirects absorbés dont le principe a été décrit précédemment (chapitre 4.1).

Cette étude ne permet pas d'appréhender la sensibilité et la spécificité des tests, à cause de l'absence de "Gold Standard" c'est à dire la mise en évidence de *M.paratuberculosis* dans les matières fécales et/ou les organes cibles.

Par contre, les tests pourront être comparés deux à deux pour la symétrie des résultats obtenus (test Mc Nemar) ainsi que la concordance de ceux-ci (test Kappa de Cohen) (cf. matériels et méthodes).

La comparaison effectuée permettra de donner une information sur ces deux paramètres. Les sérums provenant de 4 fermes différentes ont été utilisés:

- ✓ **La ferme Mar:** cette ferme a un statut officiel indemne de la tuberculose bovine (*M.bovis*) et elle est aussi classée indemne de la paratuberculose. Les animaux ont été testés pour la paratuberculose à l'aide de tests cutanés et de test interféron- γ , 2 fois à un intervalle de 6 semaines, ces animaux sont classés négatifs à ces deux tests. Les sérums de 66 animaux ont été testés par les trois ELISA (cf. résultats tableau 9).
- ✓ **La ferme Mi:** il s'agit d'une ferme dont les animaux ont été naturellement infectés par *M.paratuberculosis*. Les sérums de 58 animaux ont été testés dans cette étude pour la comparaison entre l'ELISA LAM et l'ELISA IDEXX uniquement (cf. résultats tableau 8).
- ✓ **La ferme Van:** est une ferme dont les animaux ont aussi été infectés naturellement. Les sérums de 56 animaux ont été testés par les trois ELISA (cf. résultats tableau 9).
- ✓ **La ferme Ser:** il s'agit d'une ferme dont les animaux ont été vaccinés, les sérums de 39 animaux ont été testés par les trois ELISA (cf. résultats tableau 9).

Mar	Ferme indemne			Van	Ferme infecté naturellement			Ser	Ferme vaccinée		
n° de l'animal	LAM	Pourquier	IDEXX	n° de l'animal	LAM	Pourquier	IDEXX	n° de l'animal	LAM	Pourquier	IDEXX
1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	+	-
2	-	-	-	2	-	-	-	2	-	-	-
3	-	-	-	3	-	-	-	3	-	+	-
4	-	-	-	4	-	-	-	4	-	-	-
5	-	-	-	5	-	-	-	5	-	+	-
6	-	-	-	6	-	-	-	6	-	-	-
7	-	-	-	7	-	-	-	7	-	+	-
8	-	-	-	8	-	-	-	8	-	-	-
9	-	-	-	9	-	-	-	9	-	+	-
10	-	-	-	10	-	-	-	10	+	+	-
11	-	-	-	11	-	-	-	11	-	-	-
12	-	-	-	12	-	-	-	12	+	-	-
13	-	-	-	13	-	-	-	13	-	-	-
14	-	-	-	14	-	-	-	14	+	+	+
15	-	-	-	15	-	-	-	15	-	-	-
16	-	-	-	16	-	-	-	16	-	-	-
17	-	-	-	17	-	-	-	17	-	-	-
18	-	-	-	18	-	-	-	18	+	+	+
19	-	-	-	19	-	-	-	19	+	+	-
20	-	-	-	20	-	-	-	20	+	-	-
21	-	-	-	21	-	-	-	21	-	-	-
22	-	-	-	22	-	-	-	22	+	+	-
23	-	-	-	23	-	-	-	23	+	-	-
24	-	-	-	24	-	-	-	24	+	-	-
25	-	-	-	25	-	-	-	25	+	+	-
26	-	-	-	26	-	-	-	27	+	-	-
27	-	-	-	27	-	-	-	28	+	+	-
28	-	-	-	28	-	-	-	29	+	+	-
29	-	-	-	29	-	-	+	30	+	+	+
30	-	-	-	30	-	-	-	31	+	+	+
31	-	-	-	31	+	-	-	32	+	-	+
32	-	-	-	32	-	-	-	33	+	-	+
33	-	-	-	33	-	-	-	34	+	-	-
34	-	-	-	34	-	-	-	35	+	-	-
35	-	-	-	35	-	-	-	36	+	-	+
36	-	-	-	36	-	-	-	37	+	+	-
37	-	-	-	37	-	-	+	38	+	+	+
38	-	-	-	38	-	-	-	39	+	+	+
39	-	-	-	39	-	-	-	40	-	+	-
40	-	-	-	40	-	-	-				
41	-	-	-	41	-	-	-				
42	-	-	-	42	-	-	-				
43	-	-	-	43	-	-	-				
44	-	-	-	44	-	-	-				
45	-	-	-	45	+	-	-				
46	-	-	-	46	-	-	-				
47	-	-	-	47	-	-	-				
48	-	-	-	48	-	-	-				
49	-	-	-	49	-	-	-				
50	-	-	-	50	-	-	-				
51	-	-	-	51	-	-	-				
52	-	-	-	52	-	-	-				
53	-	-	-	53	-	-	-				
54	-	-	-	54	-	-	-				
55	-	-	-	55	-	-	-				
56	-	-	-	56	-	-	-				
57	-	-	-								
58	-	-	-								
59	-	-	-	Tableau 9: résultats sérologiques obtenus par l'ELISA LAM, l'ELISA de la firme							
60	-	-	-	Pourquier et l'ELISA de la firme IDEXX sur les fermes Mar, Van et Ser.							
61	-	-	-								
62	-	-	-								
63	-	-	-								
64	-	-	-								
65	-	-	-								
66	-	+	-								

4.6.1. Comparaison entre l'ELISA LAM et l'ELISA IDEXX

Ces résultats regroupent les 4 fermes: Mi, Ser, Van et Mar.

		ELISA IDEXX		
		<i>positifs</i>	<i>négatifs</i>	Total
ELISA LAM	<i>positifs</i>	14	20	34
	<i>négatifs</i>	6	179	185
	Total	20	199	219

Test de Mc Nemar (applicable: $20+6 > 10$):

La valeur trouvée pour notre comparaison est de 7.53, l'hypothèse H_0 est rejetée: il n'y a pas de symétrie: il y a significativement plus de sérologie positives en ELISA LAM (34) qu'en ELISA de la firme IDEXX (20). De la même façon il y a significativement plus de sérologie négatives en ELISA de la firme IDEXX (199) qu'en ELISA LAM (185).

Test du Kappa de Cohen (applicable : $N > 2.r^2$; $219 > 8$):

Le coefficient Kappa observé est 0.45. Cette valeur se trouve 0.4 et 0.75, signifiant qu'il y a une bonne concordance.

Comme $N > 25$, on peut utiliser l'approximation gaussienne: $Z^{obs} = 3.57$, la p -value est comprise entre 0.001 et 0.0001. L'erreur de se tromper en affirmant que la concordance observée est vraiment significative se situe entre 0.1% et 0.01%: La concordance de ces résultats est donc significative et n'est pas due au hasard.

Les résultats montrent qu'il n'y a pas symétrie mais qu'il y a une concordance: les taux de réponses positives donnés par les deux techniques diffèrent significativement et donc, l'ELISA LAM surpasse l'ELISA de la firme IDEXX mais la plus faible, l'ELISA de la firme IDEXX est concordante avec la première.

4.6.2. Comparaison l'ELISA LAM et l'ELISA Pourquoi

Ces résultats regroupent les 3 fermes: Ser, Van et Mar.

		ELISA Pourquoi		
		<i>positifs</i>	<i>négatifs</i>	Total
ELISA LAM	<i>positifs</i>	13	12	25
	<i>négatifs</i>	7	129	136
	Total	20	141	161

Test de Mc Nemar (applicable: $12+7 > 10$):

La valeur trouvée pour notre comparaison est de 1.31, l'hypothèse H_0 est acceptée: il y a symétrie: il y a autant de chance d'obtenir des sérologies positives et négatives avec l'ELISA LAM et avec l'ELISA de la firme Pourquoi.

Test Kappa de Cohen (applicable : $N > 2.r^2$; $161 > 8$):

Le coefficient Kappa observé est 0.51. Cette valeur se trouve 0.4 et 0.75 signifiant qu'il y a une bonne concordance.

Comme $N > 25$, on peut utiliser l'approximation gaussienne: $Z^{\text{obs}} = 3.65$, la p -value est comprise entre 0.001 et 0.0001. L'erreur de se tromper en affirmant que la concordance observée est vraiment significative se situe entre 0.1% et 0.01%: La concordance de ces résultats est donc significative et n'est pas due au hasard.

Les résultats montrent qu'il y a symétrie et concordance: les taux de réponses positives données par les deux techniques sont comparables, et elles peuvent se compléter.

4.6.3. Interprétation

Une étude a montré les résultats suivants: la sensibilité du test ELISA de la firme Pourquier est de 40.8% et sa spécificité de 99.8%, ce test est actuellement le meilleur test ELISA commercialisé. Le test ELISA de la firme IDEXX a une sensibilité de 38.9% et une spécificité de 97.4%, ce qui fait de lui un des tests ELISA les moins performants du marché (Van Maanen, 2002).

Les résultats des tests statistiques effectués ici nous suggèrent que les caractéristiques intrinsèques (sensibilité et spécificité) de l'ELISA LAM et de l'ELISA de la firme Pourquier sont équivalentes.

Les trois tests ELISA présentés ici diffèrent principalement dans le mode de préparation des extraits de *M.paratuberculosis* et de *M.phlei*. Les extraits de *M.paratuberculosis* servent comme antigène et les extraits de *M.phlei* servent dans l'étape d'absorption. De plus la réponse humorale bovine ne produit pas des anticorps identiques d'un animal à un autre.

Ces deux facteurs: la différence de préparation des antigènes utilisés de *M.paratuberculosis* entre ces trois ELISA et la diversité d'anticorps produits font que certains sérums ne sont pas reconnus positifs par ces trois ELISA en même temps.

Les résultats sérologiques reflètent le statut des fermes, la ferme indemne (Mar) n'a pas de sérologie positive (à l'exception d'un seul sérum reconnu par un seul test), les fermes infectées naturellement (Mi et Van) ont très peu de sérums positifs et montrent une différence de prévalence, et la ferme vaccinée (Ser) montre beaucoup d'animaux ayant une sérologie positive (cf. tableau 9). Dans cette ferme, on ne peut pas distinguer les animaux vaccinés contre *M.paratuberculosis* des animaux infectés par ce dernier.

4.7. La fusion cellulaire

La fusion cellulaire a pour objectif la production et la caractérisation d'anticorps monoclonaux spécifiques du LAM de *M.paratuberculosis*. A cette fin nous avons donc immunisé des souris selon différents protocoles. Ces souris seront utilisées pour deux types de fusion, une fusion utilisant un kit commercial et une fusion dite classique.

4.7.1. Résultats de l'immunisation des souris

L'immunisation des souris s'est fait sur la base de trois protocoles différents:

- ✓ **Le groupe de souris A.** Les souris BALB/c ont été infectées avec des bactéries *M.paratuberculosis* vivantes. Un mg de bactéries (soit approximativement 10^7 CFU colonie forming unit) est injecté par souris par voie intraveineuse 3 fois à un intervalle de 2 mois.
- ✓ **Le groupe de souris B.** Les souris BALB/c ont été inoculées avec 0.1 mg de mycobactéries (soit approximativement 10^6 CFU) par voie sous cutanée. Les bactéries sont injectées en présence de 25 µg d'adjuvant QuilA par souris. L'immunisation est effectuée toutes les trois semaines jusqu'à obtention d'un résultat positif.
- ✓ **Le groupe de souris C.** Les souris BALB/c ont été inoculées avec le culot bactérien obtenu lors de la préparation du LAM. 0.1 mg de protéines totales a été injecté par souris par voie intra péritonéale avec un adjuvant incomplet de Freund toutes les trois semaines jusqu'à obtention d'un résultat positif.

Les résultats des différentes immunisations des souris sont donnés tableau 10.

Souris du Groupe A	Densité optique à 492 nm.	
	NA	Abs
1	0.108	0.057
2	0.132	0.065
3	0.096	0.067
4	0.082	0.056
5	0.083	0.062
6	0.08	0.061
7	0.085	0.057
8	0.248	0.112
9	0.052	0.062
10	0.089	0.057

Souris du Groupe B	Densité optique à 492 nm.	
	NA	Abs
1	0.109	0.059
2	0.083	0.056
3	0.072	0.048
4	0.095	0.075
5	0.105	0.064
6	0.101	0.085
7	0.177	0.075
8	0.074	0.051
9	0.094	0.067
10	0.080	0.053

Souris du Groupe C	Densité optique à 492 nm.	
	NA	Abs
1	0.117	0.066
2	0.162	0.102
3	1.17	0.796
4	1.309	1.108
5	2.528	2.061
6	0.331	0.128
7	1.265	1.819
8	0.146	0.183
9	0.332	0.520

Tableau 10: résultats sérologiques obtenus par l'ELISA LAM des différents groupes de souris immunisées sans (NA) et avec (Abs) une étape d'absorption par le LAM de *M.phlei*.

Dans le groupe A des souris, seule la souris n° 8 semble donner un début de réponse à l'ELISA LAM, dans le groupe B, aucune souris ne répond favorablement et dans le groupe C des souris, 4 répondent très favorablement à l'ELISA LAM.

Les souris utilisées pour la fusion (une à chaque fois) sont les n° 3, 4, 5 et 7 du groupe C, la méthode d'immunisation avec le culot bactérien donne apparemment une réponse immunitaire de la souris plus rapide que les deux autres.

4.7.2. Les fusions

Les deux premières fusions, une réalisée avec le kit ClonaCell et l'autre avec la méthode classique n'ont pas donné de clones.

Le même phénomène s'est produit pour ces deux fusions, la fusion entre les cellules de la rate des souris et les cellules de myélome a bien fonctionné, vers la deuxième semaine les hybridomes obtenus ont cessé de croître et ont commencé à mourir. Une des hypothèses envisagée est que nos cellules SP2 pouvaient être infectées par des mycoplasmes.

Une troisième fusion a été effectuée dans laquelle une nouvelle souris, d'autres macrophages ainsi qu'un nouveau lot de SP2 ont été utilisés.

La fusion est actuellement à l'étape de clonage. Les résultats des premiers tests en ELISA LAM montrent qu'il y aurait peut être 9 candidats potentiels qui présentent des résultats intéressants mais ils doivent être encore clonés (tableau 11).

Hybridome	1 ^{er} criblage
2A2	0.124
2B6	0.128
3A7	0.094
4D8	0.140
3B8	0.198
3G11	0.226
3A6	0.129
3E9	0.097
1E9	0.131
Contrôle négatif	0.02

Tableau 11: résultats du criblage des hybridomes avant clonage, les hybridomes présentés ici sont ceux qui donnent les plus forts signaux en ELISA LAM

5. Conclusions et perspectives

5.1. ELISA LAM

5.1.1. Mise au point de l'ELISA LAM sur le colostrum

L'ELISA LAM est un ELISA qui nécessite la préparation du LAM de *M.paratuberculosis* et du LAM de *M.phlei*. Le LAM de *M.paratuberculosis* sert d'antigène, le LAM de *M.phlei* sert à l'étape d'absorption.

La mise au point de l'ELISA LAM sur les colostrums a nécessité le test de nombreux paramètres: le mode de préparation des colostrums, l'étape de saturation, l'étape d'absorption avec le LAM de *M.phlei* et le test de deux conjugués, la protéine G et le 1C8. Le colostrum tout comme le lait a une composition différente de celle du sérum, ce qui suggérait des problèmes de bruit de fond pour l'ELISA LAM.

Dans les premiers tests ELISA LAM, les colostrums dilués à 1/2 présentaient des densités optiques élevées qui étaient dues en partie à un bruit de fond. Pour résoudre ce problème, trois conditions pouvant éliminer ce bruit de fond ont été testées: l'étape de préparation des colostrums (écrémage ou traitement à la présure), la saturation (BSA ou hydrolysate de caséine ainsi que le temps d'incubation) et la dilution des colostrums.

Le traitement du colostrum par la présure ne semble pas influencer de façon significative les résultats obtenus en ELISA LAM par rapport à un colostrum simplement écrémé. La présure agit sur la caséine, celle-ci étant dégradée devrait si elle était responsable d'un bruit de fond diminuer de façon significative le bruit de fond, ce qui n'est pas le cas ici.

L'étape de saturation testée dans différentes conditions dès le début sur les dilutions de colostrum dilué au 1/2, a montré une diminution des densités optiques que ce soit pour l'utilisation de la sérum albumine bovine ou l'hydrolysate de caséine. Par la suite, nous avons vérifié l'étape de saturation sur les dilutions en série des colostrums et avons constaté que sur les dilutions des colostrums à 1/100 et 1/200, l'absence ou la présence de l'étape saturation ne modifiaient pas de façon significative les résultats. Finalement bien que nous ayons utilisé cette étape lors de tous les tests présentés, elle ne semble pas nécessaire lorsque les échantillons de colostrums sont suffisamment dilués.

L'étape d'absorption des colostrums par le LAM de *M.phlei* fonctionne aussi bien que l'absorption des sérums. Nous n'avons pas eu de mise au point particulière de cette étape pour les colostrums.

Tous les tests de mise au point de l'ELISA LAM sur les colostrums ont été effectués en double afin de comparer la protéine G et le 1C8 utilisés comme conjugués. Le test du 1C8 a été effectué car il était déjà utilisé dans le protocole de l'ELISA *Brucella* lait et qu'il fonctionnait (Kerkhofs et al, 1990), la protéine G n'était pas recommandée pour cette utilisation (communication personnelle, J.Godfroid). Finalement, le conjugué 1C8 s'est avéré être instable, cette instabilité était peut être due à un problème de couplage avec la peroxydase. La protéine G a fonctionné correctement et nous avons décidé de le conserver dans le protocole de l'ELISA LAM sur le colostrum.

- ❖ Le problème du bruit de fond que nous obtenions sur les colostrums dilués à 1/2 est probablement dû à la concentration en anticorps plutôt qu'à la matrice du lait.
- ❖ La saturation par l'hydrolysate de caséine n'est pas nécessaire: le LAM est un lipopolysaccharide et il sature lui-même bien le fond de la plaque de l'ELISA ne laissant que peu de place pour la fixation d'éléments aspécifiques. Ce phénomène est aussi observé pour le LPS de *Brucella* qui ne nécessite pas de saturation préalable.

5.1.2. Test de colostrums

➤ Choix de la dilution

La mise au point de l'ELISA LAM effectuée sur les colostrums a nécessité le choix de deux dilutions 1/100 ou 1/200. Le test d'un grand nombre de colostrum a permis de déterminer la dilution adéquate de 1/200.

Le protocole de l'ELISA LAM sérum a été adapté pour le colostrum avec une étape préliminaire d'écémage et une dilution finale à 1/200 des colostrums au lieu de 1/100 pour les sérums.

La concentration des différentes isotopies des anticorps présents dans le colostrum, le lait et le sérum sont:

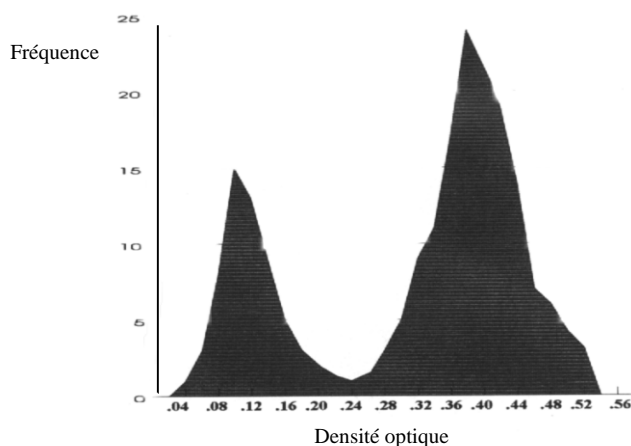
	IgM (mg/ml)	IgG1 (mg/ml)	IgG2 et IgG3 (mg/ml)	IgA (mg/ml)
Colostrum	6.77	46.4	2.87	5.36
Lait	0.086	0.58	0.005	0.081
Sérum	3.05	11.2	9.2	0.37

La concentration totale des anticorps de type IgG1, IgG2 et IgG3 pour le sérum est de 20.4 mg/ml contre 49.27 mg/ml pour le colostrum. Le choix de la dilution paraît donc correspondre avec ces données théoriques: le colostrum est dilué deux fois plus que les sérums (Goddeeris, 1998).

Le reste du protocole est identique pour le sérum ou le colostrum: les volumes des échantillons (50 µl), l'étape d'absorption avec le LAM de *M.phlei*, l'utilisation de la protéine G, restent les mêmes.

➤ Calcul du cut-off

A partir de cette mise au point, il faudrait pouvoir tester beaucoup de colostrums afin d'en déterminer le cut-off plus précis. Un moyen de le déterminer selon l'OIE (Office International des Epizooties) est de tester plus de 1000 colostrums et de faire un graphique des fréquences en fonction d'intervalle des densités optiques afin d'en voir la distribution (Jacobson, 2000).



Cette figure (d'après Crowther, 1995) est un exemple de ce que l'on peut observer dans le meilleur des cas: on distingue clairement les deux populations de sérums, la population positive et la population négative, le cut-off se situe entre les deux pics observés.

La correspondance entre la représentation graphique et le résultats du calcul du cut-off (moyenne des densités optiques des colostrums négatifs + 3 déviations standards) peut être établie. C'est ainsi qu'a été déterminé le cut-off de l'ELISA LAM sérum.

La correspondance des résultats sur les 57 couples sérum/colostrum testés est très bonne, lorsque un sérum est positif le colostrum correspondant l'est pratiquement toujours.

Le placenta des vaches est imperméable aux anticorps, les veaux naissent sans globulines. Les anticorps présents dans le sérum vont être concentrés par un mécanisme actif dans le colostrum. Le veau doit recevoir dans les 24 premières heures un maximum d'anticorps pour que ses chances de survie soient les meilleures, la concentration en anticorps des colostrums est donc importante (Goddeeris, 1998). Le colostrum est donc le reflet des anticorps présents dans le sérum et un sérum ayant un test sérologique douteux peut être positif avec le colostrum correspondant.

- ❖ Afin d'avoir une meilleure idée sur les performances de l'ELISA sérum par rapport à l'ELISA colostrum il faudrait tester un nombre bien plus élevé de couples sérum/colostrum.

5.2. Comparaison sérologique de l'ELISA LAM avec l'ELISA de la firme Pourquier et l'ELISA de la firme IDEXX

La comparaison de l'ELISA LAM avec deux ELISA commerciaux, a montré que l'ELISA LAM et l'ELISA commercialisé par la firme Pourquier semblent avoir des caractéristiques intrinsèques comparables, tandis que l'ELISA de la firme IDEXX semble avoir des caractéristiques intrinsèques moins bonne que les deux autres. L'ELISA de la firme Pourquier est actuellement le meilleur ELISA commercialisé (Van Maanen, 2002).

La nature et la préparation de l'antigène utilisé par les ELISA influent directement sur la sensibilité des tests. Les trois ELISA testés utilisent des antigènes différents de *M.paratuberculosis*: L'ELISA LAM le lipoarabinomannan, l'ELISA Pourquier un extrait protoplasmique et l'ELISA IDEXX un lysat entier cellulaire. De plus les animaux infectés par *M.paratuberculosis* ne produisent pas les mêmes anticorps contre les mêmes cibles antigéniques de cette mycobactérie. Parmi ces cibles antigéniques le LAM (un antigène immunodominant B) apparaît être très intéressant, et comme l'a montré la comparaison de l'ELISA LAM avec les deux ELISA commerciaux, l'ELISA LAM présente des caractéristiques intrinsèques comparables à l'ELISA le plus performant actuellement dans le commerce.

Les résultats obtenus avec les différents tests ELISA reflètent le statut des animaux des fermes testées vis à vis de *M.paratuberculosis*: les animaux sont indemnes ou infectés ou vaccinés. La ferme vaccinée regroupe pratiquement tous les positifs, la ferme infectée quelques uns et la ferme indemne un seul uniquement.

- ❖ Il faudrait pouvoir tester plus de sérums et mettre en évidence la présence de *M.paratuberculosis* dans les matières fécales ou les organes cibles afin de pouvoir déterminer la sensibilité et la spécificité de cet ELISA LAM.
- ❖ L'ELISA LAM semble avoir des caractéristiques intrinsèques comparables au meilleur ELISA actuellement disponible sur le marché qui est l'ELISA de la firme Pourquier.
- ❖ Les résultats obtenus pour la ferme infectée naturellement ou vaccinée montre qu'avec les trois ELISA utilisés ici, on ne peut pas faire la différence entre ces dernières.

5.3. Production d'anticorps monoclonaux anti-LAM

La technique de fusion utilisant le kit de ClonaCell était intéressante à utiliser, elle permet en effet le clonage et la sélection des hydridomes en une seule étape grâce au milieu semi-solide de méthylcellulose contrairement à la méthode classique qui nécessite deux étapes séparées. En effet, les clones vont former des petites colonies à l'œil nu dans la gélose semi-solide de méthylcellulose que l'on pourra repiquer par la suite dans le milieu de croissance. Cette méthode exige impérativement d'avoir un taux d'humidité dans l'étuve de l'ordre de 90% sans cela, la gélose semi-solide sèche et les clones meurent.

Les fusions qui ont été effectuées n'ont pas été couronnées de succès et la troisième est en cours de clonage. Les caractéristiques des anticorps monoclonaux obtenus pourront être déterminées, il s'agit de:

- ✓ L'isotypie
- ✓ Leur réactivité vis à vis des LAM de différentes espèces.

Il y a deux ans une fusion avait été effectuée par la méthode de ClonaCell et 4 anticorps avaient été obtenus 1 IgM et 3 IgG3. L'analyse de leur réactivité avait été réalisée sur le LAM extraite de 6 espèces de mycobactéries différentes: *M.smegmatis*, *M.vaccae*, *M.phlei*, *M.bovis* BCG, *M.avium* et *M.paratuberculosis*. Mais aucun de ces anticorps ne réagissaient qu'avec le LAM de *M.paratuberculosis*.

Nous espérons que les clones que nous obtiendrons avec la troisième fusion produiront des anticorps spécifiques du LAM de *M.paratuberculosis* de type IgG plus stables que les IgM.

- ❖ L'obtention d'anticorps monoclonaux spécifiques contre le LAM apparaît être difficile. il est intéressant de constater que les sérums produits par les animaux contre le LAM des mycobactéries et le LPS des bactéries gram - (ce sont tout les deux des antigènes immunodominants) sont des polysérums réagissant très fortement avec ces derniers mais la production d'anticorps monoclonaux est différente pour ces deux types d'antigènes: la production d'anticorps monoclonaux contre le LAM est difficile tandis que contre le LPS, il est nettement plus facile d'obtenir de très bons anticorps monoclonaux.

6. Bibliographie

- Agresti, A. (1994). "Wiley series in probability and statistics." *An introduction to categorical Data Analyse*, (9) 226-277.
- Asselineau, J., and Laneelle, G. (1998). "Mycobacterial lipids : a historical perspective." *Front Biosci*, 3, E164-E174.
- Barclay, R., Ewing, D. F., and Ratledge, C. (1985). "Isolation, identification, and structural analysis of the mycobactins of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, and *Mycobacterium paratuberculosis*." *J Bacteriol*, 164(2), 896-903.
- Barclay, R., and Ratledge, C. (1983). "Iron-binding compounds of *Mycobacterium avium*, *M.intracellulare*, *M.scrofulaceum*, and mycobactin-dependent *M.paratuberculosis* and *M.avium*." *J Bacteriol*, 153(3), 1138-46.
- Beard, P.M., Stevenson, K., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., Rhind, S.M., Sinclair, M.C., Wildblood, L.A., Jones, D.G., Sharp, J.M. (2001). "Experimental paratuberculosis in calves following inoculation with a rabbit isolate of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*." *J Clin Microbiol* 39(9),3080-4.
- Boelaert, F. (1997). "Dossier paratuberculose: Un problème mondial? " *Les élevages Belges*, 12, 16.
- Besra G.S.,Chatterjee D., (1994). "Lipids and carbohydrates of *Mycobacterium tuberculosis*.". Barry R. Bloom (ed) *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control*, 285-300. ASM Press.
- Brennan, P.J., and Draper, P., (1994). "Ultrastucture of *Mycobacterium tuberculosis*.". Barry R. Bloom (ed) *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control*, 271-284. ASM Press.
- Boelaert, F., Walravens, K., Biront, P., Vermeersch, J. P., Berkvens, D., and Godfroid, J. (2000). "Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population." *Vet Microbiol*, 77(3-4), 269-81.
- Bughin J., (1997) "Dossier paratuberculose: Reconnaître les signes cliniques de l'infection" *Les élevages Belges*, 12, 11-12.
- Cocito, C., Gilot, P., Coene, M., de Kesel, M., Poupart, P., and Vannuffel, P. (1994). "Paratuberculosis." *Clin Microbiol Rev*, 7(3), 328-45.
- Coussens, P. M. (2001). "*Mycobacterium paratuberculosis* and the bovine immune system." *Anim Health Res Rev*, 2(2), 141-61.
- Crowther J.R. (1995) "ELISA: theory and pratice" *Methods in molecular biology*TM, 42
- De Voss, J.J., Rutter, K., Schroeder B.G., and Barry, C.E. (1999). "Iron acquisition and metabolism by mycobacteria." *J Bacteriol. Rev*, 181(15):4443-51.
- Draper, P. (1998). "The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers." *Front Biosci*, 3, D1253-61.
- Fonteyne P-A., Portaels F., Dumonceau J-M. (1997). "Dossier paratuberculose: Y-a-t'il une relation entre la paratuberculose et la maladie de Crohn?" *Les élevages Belges*, 12, 18-20.
- Goddeeris, B., (1998) "Handbook of Vertebrate Immunology (1998). Ed by Pastoret J.P., Griebel P., Bazin H., Govaerts A. "Chapitre XIII: Immunology of Cattle". 439-484.
- Godfroid J. ,Boelaert F., Walravens K., Limbourg, B. (1997) "Paratuberculose: nouvelles approches pour une problématique actuelle. " *Journée d'étude de la Société Belge Francophone de Buatrie*
- Harris, N. B., and Barletta, R. G. (2001). "*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in Veterinary Medicine." *Clin Microbiol Rev*, 14(3), 489-512.
- Hurley Sapiro S., Splitter Gary A., Welch Rodney A. (1988). "Deoxyribonucleic acide relatedness of *Mycobacterium paratuberculosis* to other members of the family *Mycobacteriaceae*". *Int J Syst Bacteriol*, 38(2),143-146.
- Jacobson, R.,(2000) "Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases". *Manual of standards for Diagnostic Tests and Vaccines 4^e edition OIE*, Chapitre I.1.3.

- Jark, U., Ringena, I., Franz, B., Gerlach, G. F., and Beyerbach, M. (1997). "Development of an ELISA technique for serodiagnosis of bovine paratuberculosis." *Vet Microbiol*, 57(2-3), 189-98.
- Johnson-Ifearulundu, Y., and Kaneene, J. B. (1999). "Distribution and environmental risk factors for paratuberculosis in dairy cattle herds in Michigan." *Am J Vet Res*, 60(5), 589-96.
- Kapur, V., Li, L., Amonsin, A., Zhang, Q., and Bannantine, J. (2002). "Genome sequencing and analysis of the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*." 7th International Colloquium on Paratuberculosis, Bilbao.
- Kennedy, D. J., and Benedictus, G. (2001). "Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species." *Rev Sci Tech*, 20(1), 151-79.
- Kerkhofs P., Botton Y., Thiange P., Dekeyser P., Limet JN.(1990) "Diagnosis of bovine brucellosis by enzyme immunoassay of milk" *Vet Microbiol*, 24(1), 73-80.
- Legrand, E., Sola, C., Rastogi, N. (1999). "Le complexe *Mycobacterium avium*-intracellulaire: marqueurs phénotypiques et génotypiques et les bases moléculaires de la transmission inter-espèces." Troisième colloque du réseau international des Instituts Pasteur et institut associés. Manuscript n°2155/RIP 7.
- Manning, E. J., and Collins, M. T. (2001). "*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis." *Rev Sci Tech*, 20(1), 133-50.
- McNeil, M. R., and Brennan, P. J. (1991). "Structure, function and biogenesis of the cell envelope of mycobacteria in relation to bacterial physiology, pathogenesis and drug resistance; some thoughts and possibilities arising from recent structural information." *Res Microbiol*, 142(4), 451-63.
- Minnikin, D. E. (1991). "Chemical principles in the organization of lipid components in the mycobacterial cell envelope." *Res Microbiol*, 142(4), 423-7.
- Naser, S. A., Gillespie, R. F., Naser, N. A., and El-Zaatari, F. A. (1998). "Effect of *IS900* gene of *Mycobacterium paratuberculosis* on *Mycobacterium smegmatis*." *Curr Microbiol*, 37(6), 373-379.
- Nikaido, H., and Jarlier, V. (1991). "Permeability of the mycobacterial cell wall." *Res Microbiol*, 142(4), 437-43.
- Olsen, I., Sigurgardottir, G., and Djonne, B. (2002). "Paratuberculosis with special reference to cattle. A review." *Vet Q*, 24(1), 12-28.
- Rastogi, N. (1991). "Recent observations concerning structure and function relationships in the mycobacterial cell envelope: elaboration of a model in terms of mycobacterial pathogenicity, virulence and drug-resistance." *Res Microbiol*, 142(4), 464-76.
- Rogall, T., Wolters, J., Flohr, T., and Bottger, E. C. (1990). "Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus *Mycobacterium*." *Int J Syst Bacteriol*, 40(4), 323-30.
- Selby, W. (2000). "Pathogenesis and therapeutic aspects of Crohn's disease." *Vet Microbiol*, 77(3-4), 505-11.
- Servais L. (1997) "Dossier paratuberculose: La paratuberculose: une maladie d'actualité?" *Les élevages Belges*, 12, 9-11.
- Stabel, J. R. (2000). "Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*." *Vet Microbiol*, 77(3-4), 465-73.
- Stahl, D. A., and Urbance, J. W. (1990). "The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the mycobacteria." *J Bacteriol*, 172(1), 116-24.
- Streeter, R. N., Hoffsis, G. F., Bech-Nielsen, S., Shulaw, W. P., and Rings, D. M. (1995). "Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows." *Am J Vet Res*, 56(10), 1322-4.
- Strohmeier, G. R., and Fenton, M. J. (1999). "Roles of lipoarabinomannan in the pathogenesis of tuberculosis." *Microbes Infect*, 1(9), 709-17.
- Sung, N., and Collins, M. T. (1998). "Thermal tolerance of *Mycobacterium paratuberculosis*." *Appl Environ Microbiol*, 64(3), 999-1005.

- Thorel, M. F., Krichevsky, M., and Levy-Frebault, V. V. (1990). "Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium subsp. avium subsp. nov.*, *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis subsp. nov.*, and *Mycobacterium avium subsp. silvaticum subsp. nov.*" *Int J Syst Bacteriol*, 40(3), 254-60.
- Van Maanen, C., Koster, C., Van Veen, B., Kalis, C.H.J., and Collins, M.T.(2002). "Validation of *Mycobacterium paratuberculosis* antibody detecting ELISAs." 7th International Colloquium on Paratuberculosis.
- Venisse, A., Berjeaud, J.M., Chaurand, P., Gilleron, M., and Puzo, G. (1993). "Structural features of lipoarabinomannan from *Mycobacterium bovis* BCG. Determination of molecular mass by laser desorption mass spectrometry." *J Biol Chem*, 268(17), 12401-11.
- Whitlock, R. H., Wells, S. J., Sweeney, R. W., and Van Tiem, J. (2000). "ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method." *Vet Microbiol*, 77(3-4), 387-98.